REGENERAÇÃO DE PLANTAS "IN VITRO" E RADIOSSENSITIVIDADE DE TECIDOS NUCELARES DE CITROS

MOACIR PASQUAL

Orientador : Prof. Dr. AKIHIKO ANDO

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho, 1985

*À minha esposa Maria Cristina
e aos meus filhos Christiane,
Alexander e Leandro*

D E D I C O

AGRADECIMENTOS

Às seguintes Instituições, pela oportunidade do curso e facilidades no desenvolvimento do trabalho de tese:

- . *Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária S.A. (EMPASC)*
- . *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária S.A. (EMBRAPA)*
- . *Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ)*
- . *Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA)*
- . *Estação Experimental de Limeira/Instituto Agrônomo de Campinas (IAC)*

À amizade, incentivo, apoio e colaboração de:

Dr. Akihiko Ando
Dr. Otto Jesu Crócomo
Dr. Augusto Tulmann Neto
Dr. José Otávio Machado Menten
Dr. Antonio Natal Gonçalves
Dr. Joaquim Teófilo Sobrinho
Dr. Carlos Henrique Mattioli
Benedita Inês Possignolo Rodrigues
Enio Tiago Oliveira
José Benedito Alves
Paulo Cassieri Neto
Wlamir de Aguiar Godoy
Otávio Minoru Matsumoto

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Página

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1. Poliembriõia	03
2.2. Embriogênese em tecidos nucelares	06
2.2.1. Embriogênese em nucelos	06
2.2.2. Embriogênese em óvulos	07
2.2.3. Embriogênese em calos nucelares	09
2.2.4. Efeitos do meio de cultura	11
2.2.4.1. Substâncias orgânicas complexas	11
2.2.4.2. Vitaminas	13
2.2.4.3. Reguladores de crescimento	13
2.2.5. Efeitos de subcultivos	15
2.2.6. Efeitos de irradiação	16
2.2.7. Desenvolvimento de embriões	18
2.2.8. Variação somaclonal	20
2.3. Melhoramento das espécies cítricas	22
2.3.1. Métodos convencionais	22
2.3.2. Cultura de embriões "in vitro"	22
2.3.3. Uso de protoplastos	24
2.3.4. Indução de mutações	25
2.3.4.1. Irradiação de tecidos multicelulares	25
2.3.4.2. Irradiação de tecidos nucelares	26

2.3.4.3. Irradiação de calos nucelares	27
2.3.4.4. Agentes mutagênicos em protoplastos	28
2.3.4.5. Agentes mutagênicos em plântulas decapitadas	28
2.3.4.6. Seleção de mutantes	29
2.4. Propagação vegetativa "in vitro"	30
2.4.1. Micropropagação	30
2.4.2. Indução de calos em segmentos da planta	32
2.4.3. Organogênese em calos	33
2.4.4. Enraizamento dos brotos	33
2.5. Cultura de segmentos do fruto	34
2.6. Remoção das plantas para o solo	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1. Assepsia	39
3.2. Meio de cultura	40
3.3. Condições de crescimento	40
3.4. Cultura de nucelos de 'Valência'	41
3.4.1. Extração do nucelo	41
3.4.2. Diferentes concentrações de auxina/citocinina	41
3.4.3. Irradiação de tecido nucelar	42
3.5. Cultura de óvulos abortivos de 'Pera'	43
3.5.1. Diferentes fases de desenvolvimento	43
3.5.2. Diferentes meios de cultura	43
3.6. Cultura de calos de 'Valência'	44
3.6.1. Desenvolvimento de pseudobulbilhos	44

3.6.2. Irradiação de calos globulares (pseudobulbilhos) . . .	44
3.7. Individualização de embriões	45
3.7.1. Processo seguido para todos os experimentos	45
3.7.2. Enraizamento de embriões de 'Valência'	45
3.8. Propagação clonal de 'Valência' e 'Trifoliata'.	45
3.8.1. Multiplicação de gemas axilares	45
3.8.2. Enraizamento de brotos	46
3.9. Cultura de segmentos do fruto de 'Pera'	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1. Cultura de nucelos de 'Valência' em diferentes níveis de au xina e citocinina	49
4.2. Irradiação do tecido nucelar de 'Valência'	57
4.3. Cultura de óvulos abortivos em diferentes fases	68
4.4. Cultura de óvulos abortivos em diferentes meios	70
4.5. Desenvolvimento de pseudobulbilhos de 'Valência'.	71
4.6. Irradiação de calos globulares de 'Valência'	73
4.7. Enraizamento de embriões de 'Valência'	75
4.8. Cultura de gemas axilares	79
4.8.1. Cultivar 'Valência'	79
4.8.2. Cultivar 'Trifoliata'	81
4.8.3. Enraizamento de brotos	84
4.9. Cultura de segmentos do fruto de 'Pera'	86
4.10. Remoção das plantas para o solo	88

5. CONCLUSÕES	92
-------------------------	----

6. LITERATURA CITADA	95
--------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela</i>	<i>Página</i>
1 Número médio de embriões obtidos em cultura de nucelos de 'Valência' em diferentes combinações de Cin e 2,4-D expostos à luz	50
2 Número médio de embriões obtidos em cultura de nucelos de 'Valência' em diferentes combinações de Cin e 2,4-D mantidos no escuro	51
3 Observações realizadas em nucelos de 'Valência' cultivados em diferentes combinações de Cin e 2,4-D	53
4 Número de embriões obtidos em cultura de nucelos de 'Valência' submetidos a diferentes doses de radiação gama na inoculação (A), uma (B), duas (C) e três semanas depois (D)	58
5 Observações realizadas em cultura de nucelos de 'Valência' submetidos a diferentes doses de radiação gama na inoculação (A), uma (B), duas (C) e três (D) semanas depois	59
6 Número de embriões obtidos em cultura de nucelos de 'Valência' após irradiação (em diferentes doses) do meio (E), do nucelo (F) ou do meio e do nucelo (G)	61
7 Observações realizadas em cultura de nucelos de 'Valência' após irradiação (em diferentes doses) do meio (E), do nucelo (F) ou do meio e do nucelo (G)	62

8	Desenvolvimento de embriões (%) individualizados oriundos de nucelos submetidos a diferentes doses de radiação na inoculação (A), uma (B), duas (C) ou três (D) semanas depois .	66
9	Desenvolvimento de embriões individualizados obtidos de nucelos após irradiação (em diferentes doses) do meio (E) , do nucelo (F) ou do nucelo e do meio (G)	67
10	Embriões (Nº) e calos (%) obtidos a partir de cultura de óvulos abortivos de 'Pera' em diferentes fases de desenvolvimento	69
11	Embriões (Nº), plantas e calos (%) obtidos em cultura de óvulos de 'Pera' em meio "MS" adicionado de diferentes substâncias de crescimento	71
12	Desenvolvimento de pseudobulbilhos cultivados em meio "MS" adicionado de diferentes substâncias de crescimento	72
13	Número de embriões obtidos de calos globulares submetidos a diferentes doses de radiação gama	73
14	Enraizamento de embriões (%) oriundos de calos nucleares e de nucelos em diversos hormônios adicionados ao meio "MS"	78
15	Desenvolvimento do sistema radicular de plântulas de 'Valência' (que apresentavam apenas a raiz principal) em meio "MS" adicionado de NAA	79

Tabela

Página

16	Número médio de brotos em cultura de gemas axilares de 'Valência' em diferentes combinações de BAP e NAA	80
17	Número médio de brotos em cultura de gemas axilares de 'Trifoliata' em diferentes níveis de NAA e BAP	82
18	Enraizamento de brotos (%) de 'Valência' e 'Trifoliata' em meio "MS" suplementado por vários reguladores de crescimento	85
19	Produção de calos (%) da cv. 'Pera' a partir de albedo e vesículas em meio "MT" adicionado de diferentes concentrações de Cin e 2,4-D	87
20	Produção de calos (%) da cv. 'Pera' a partir de albedo e vesículas em meio "MT" adicionado de diferentes concentrações de Cin e IAA	88

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		<i>Página</i>
1	Número médio de embriões por nucelo nos diferentes níveis de Cin e 2,4-D	50
2	Diferenciação de embriões a partir de núclos de 'Valência' após 9 semanas de cultivo em diferentes níveis de Cin.	51
3	Embriões de 'Valência' diferenciados a partir de núclos cultivados "in vitro" na ausência de Cin e 2,4-D	54
4	Produção de calos (%) a partir de núclos de 'Valência' cultivados em diferentes níveis de Cin e 2,4-D (A-0,0; B-0,5; C-1,0 e D-2,0 mg/l)	56
5	Número de embriões obtidos em cultura de núclos submetidos a diferentes doses de radiação gama e em diferentes fases	58
6	Número de embriões obtidos de núclos após irradiação (em diferentes fases) do meio (E), do nucelo (F) ou do nucelo e do meio (G)	61
7	Núclos que produziram calos (%) após irradiação (em diferentes doses) do meio (E), do nucelo (F) ou do meio e do nucelo (G)	64
8	Calos globulares obtidos de núclos de 'Valência' cultivados em meio irradiado, mostrando elevado potencial embriogênico	65

Figura

Página

9	Calos de 'Pera' oriundos de óvulos abortivos evidenciando a presença de pro-embriões	69
10	Número de embriões obtidos de calos globulares submetidos a diferentes doses de radiação gama	75
11	Embriões de 'Valência' obtidos de nucelos após nove semanas de cultura em meio básico "MS"	76
12	Desenvolvimento da plântula a partir de embriões de 'Valência' obtidos de cultura de nucelos e individualizados em meio básico "MS"	77
13	Número médio de brotos com mais de 1 cm, obtidos em cultura de gemas axilares de 'Valência' em diferentes combinações de NAA e BAP	80
14	Multiplicação de 'Valência' a partir de gemas axilares cultivadas em NAA-0,2 mg/l e várias concentrações de BAP	81
15	Número médio de brotos com mais de 1 cm obtidos em cultura de gemas axilares de 'Trifoliata' em diferentes combinações de NAA e BAP	83
16	Enraizamento de brotos de 'Trifoliata' em meio "MS" adicionado de IBA-2,0 mg/l	86
17	Plântulas de 'Valência' obtidas de cultura de nucelos, prontas para serem removidas dos tubos de ensaio para o solo	89

Figura

Página

18	Plântula de 'Valência' obtida de cultura de nucelos, com	
	aproximadamente 1 ano após a remoção dos tubos de ensaio	90

ABREVIATÖES

A caracterização do meio de cultura e as diversas substâncias que compõe o meio são referidas no decorrer do trabalho através de abreviaturas cujo significado é dado a seguir:

"MS" = *MURASHIGE e SKOOG (1962)*

"MT" = *MURASHIGE e TUCKER (1969)*

EM = extrato de malte

EL = extrato de levedura

CH = caseína hidrolizada

AC = água de côco

Cin = cinetina

2iP = 2-isopenteniladenina

AA = ácido ascórbico

AD = adenina

ADS = sulfato de adenina

ACi = ácido cítrico

GA₃ = ácido giberélico

IAA = ácido indolacético

NAA = ácido naftalenoacético

IBA = ácido indolbutírico

BAP = benzil aminopurina

2,4-D = ácido 2,4-diclorofenoxi-acético

5-HNB = 2-hidroxi-5-nitro benzilbromida

AG = 8-aza-guanina

CCC = 2-cloro-etilmetilamonía

alar = ácido 2,2-metilhidrazida

"CURRICULUM VITAE"

MOACIR PASQUAL, nascido a 25 de janeiro de 1949 em Videira -SC., recebeu o título de Engenheiro Agrônomo em dezembro de 1971 pela Escola de Agronomia "Eliseu Maciel", da Universidade Federal de Pelotas - Pelotas-RS. e, de Mestre em Agronomia, área de Concentração Fitotecnia, em dezembro de 1976, pela Escola Superior de Agricultura de Lavras - Lavras-MG.

Desde janeiro de 1972, exerceu suas atividades profissionais em pesquisa com Fruticultura de Clima Temperado, junto às Estações Experimentais de Videira e Caçador-SC.; inicialmente pelo extinto Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuárias do Sul (IPEAS)-Departamento Nacional de Pesquisa e Experimentação Agropecuárias (DNPEA), a partir de janeiro de 1974 pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), e, de junho de 1978 a março de 1985 pela Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária (EMPASC). Durante este período foi autor de 40 trabalhos científicos publicados, na maioria contemplando aspectos que envolvem o melhoramento das fruteiras de clima temperado e, a polinização e quebra de dormência da macieira (*Malus domestica* Borkh.).

Atualmente, pela Seção de Radiogenética do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), órgão da Universidade de São Paulo (USP), desenvolve trabalhos de pesquisa com melhoramento de plantas através da indução de mutações e fazendo uso das técnicas de cultura de tecidos e células.

REGENERAÇÃO DE PLANTAS "IN VITRO" E RADIOSSENSITIVIDADE DE TECIDOS NUCELARES DE CITROS

Autor: *MOACIR PASQUAL*

Orientador: Prof. Dr. Akihiko Ando

RESUMO

Existem diversas limitações, como apomixia, esterilidade gamética e incompatibilidade, ao melhoramento das espécies cítricas, razão da maioria das cultivares ter se originado por mutações espontâneas.

Procurou-se através deste trabalho, determinar uma metodologia para regeneração de plantas a partir de nucelos, calos nucelares e gemas axilares, bem como, para induzir mutantes com o uso de radiação gama, de forma a explorar os benefícios oferecidos pelas técnicas de cultura de tecidos e células.

Nucelos da cv. 'Valência' e óvulos abortivos da cv. 'Pera' foram cultivados "in vitro" em meio "MS" adicionado de várias substâncias reguladoras do crescimento. Tanto nucelos extraídos de frutos de 'Valência' com aproximadamente 12 semanas após a polinização, como calos oriundos destes mesmos nucelos, foram submetidos a diferentes doses de radiação gama e cultivados "in vitro". Gemas axilares de 'Valência' e 'Trifoliata' foram cultivadas em meio "MS" suplementado com diversas combinações de uma auxina e uma citocinina.

Houve diferenciação de embriões tanto diretamente do nucelo como via formação de calos em 'Valência' e 'Pera' e ótima multiplicação de gemas axilares em 'Valência' e 'Trifoliata'.

A adição de auxinas e citocininas inibe a embriogênese em nucelos. O aumento das doses de radiação gama sobre nucelos e calos nucelares provoca uma redução do número de embriões, mais acentuada se aplicadas em fases posteriores a inoculação. Pode-se definir uma dose de 1,0 a 2,0 kR para tratamento de nucelos em trabalhos de indução de mutações. A irradiação apenas do meio de cultura aumenta a proliferação de calos. Nota-se um elevado índice de anormalidade nos embriões principalmente com doses mais elevadas de raios gama.

O enraizamento de embriões é melhor estimulado por GA_3 -1,0 ou NAA-0,1 mg/l.

Para a cv. 'Valência', a multiplicação de gemas foi mais estimulada por NAA-0,2 + BAP-0,2 mg/l e o enraizamento de brotos por NAA-0,1 a 1,0 + IBA-2,0 mg/l, enquanto que, para 'Trifoliata' o melhor índice de multiplicação de gemas se deu com NAA-1,0 + BAP-1,0 mg/l e de enraizamento de brotos com IBA-1,0 a 2,0 mg/l ou NAA-5,0 + BAP-0,1 mg/l ou ainda NAA-1,0 + IBA-2,0 mg/l.

"IN VITRO" REGENERATION OF PLANTS AND RADIOSENSITIVITY
OF NUCELLAR TISSUES IN CITRUS

Author: *MOACIR PASQUAL*

Adviser: Prof. Dr. Akihiko Ando

SUMMARY

There are various limiting factors, such as apomixis, gametic sterility and incompatibility in the breeding of Citrus species. In view of this, the majority of Citrus cultivars have originated from spontaneous mutation.

In the present work, attempts were made to determine a methodology to regenerate plants from nucelli, nucellar callus and axillary buds, and also to induce mutants by gamma radiation in order to explore the benefits offered by the technology of tissue and cell culture.

Nucelli of the cultivar 'Valencia' and abortive ovules of the cultivar 'Pera' were cultured "in vitro" on the "MS" medium, supplemented with various growth regulators. Both nucelli, extracted from the fruits of 'Valencia' approximately 12 weeks after pollination, and callus originated from these nucelli, were irradiated with different doses of gamma-rays and cultured "in vitro". Axillary buds of 'Valencia' and 'Trifoliata' were cultured on the "MS" medium supplemented with various combinations of one auxin and one cytokinin.

Differentiation of embryoids was observed directly from nucelli as well as from nucellar callus in 'Valencia' and 'Pera', and excellent multiplication of axillary buds of 'Valencia' and 'Trifoliata' was also observed.

Addition of auxin and cytokinin inhibits the embryogenesis of nucelli. Increase of gamma-radiation dose on nucelli and nucellar callus caused a reduction in number of embryoids formed, and this was more noticeable when gamma-radiation was applied in posterior periods after inoculation. It has been concluded that gamma-ray doses of 1.0 to 2.0 kR are adequate to the treatment of nucelli in mutation breeding. High frequency of abnormality of embryoids was observed with higher doses of gamma-ray.

The rooting of embryoids was stimulated with the addition of GA₃-1.0 or NAA-0.1 mg/l.

For the cultivar 'Valencia', multiplication of buds was stimulated with the addition of NAA-0.2 + BAP-0.2 mg/l, and the rooting of shoots with the addition of NAA-0.1 to 0.2 + IBA-2.0 mg/l, while for 'Trifoliata' the highest frequency of bud multiplication occurred with NAA-1.0 + BAP-1.0 mg/l and of rooting of shoots with IBA-1.0 to 2.0 mg/l or NAA-5.0 + BAP-0.1 mg/l or NAA-1.0 + IBA-2.0 mg/l.

1. INTRODUÇÃO

A citricultura desempenha um papel de extrema importância, considerando que o Brasil é o segundo maior produtor de frutos cítricos do mundo e o primeiro exportador mundial de suco de laranja, assumindo lugar de destaque na pauta brasileira de exportações.

O melhoramento das espécies cítricas pelos métodos convencionais muito pouco tem contribuído, pois, é seriamente limitado pela ocorrência de poliembrionia, esterilidade masculina, incompatibilidade e longo período de juvenilidade dos "seedlings".

A maioria das cultivares tem sido obtida a partir de mutações espontâneas, o que demonstra um potencial de resposta destas espécies a tratamentos com agentes mutagênicos. Bons resultados tem sido obtidos através da indução de mutações em tecidos multicelulares como gemas e segmentos, conduzindo porém à formação de quimeras.

Com o desenvolvimento das técnicas de cultura de tecidos e células e a possibilidade da diferenciação de embriões a partir de células individuais do nucelo, de calos nucelares e mesmo de "seedlings" decapi

tados, a aplicação de agentes mutagênicos sobre a célula inicial responsável por esta diferenciação se constitui numa alternativa muito promissora.

Estudos de fenômenos morfológicos, citológicos e fisiológicos podem ser conduzidos "in vitro" sobre calos obtidos de qualquer parte da planta e inclusive de segmentos do fruto.

A propagação rápida de clones ou mutantes com características superiores, através da cultura de gemas axilares se constitui numa das grandes aplicações da cultura de tecidos. Esta forma de clonagem garante um fornecimento abundante de ápices meristemáticos para a microenxertia, técnica largamente utilizada na obtenção de plantas cítricas isentas de vírus.

Objetivou-se com o presente trabalho: 1) o desenvolvimento das técnicas de regeneração de plantas "in vitro" a partir de núcelos e óvulos, associadas à indução de mutações através do uso de raios gama; 2) multiplicação das plantas de 'Valência' (*Citrus sinensis*) e 'Trifoliata' (*Poncirus trifoliata*) obtidas "in vitro" por meio de cultura de gemas axilares; 3) obtenção de calos a partir de segmentos do fruto; 4) criar a oportunidade para um contacto e familiarização com as técnicas de cultura de tecidos e células, para posterior uso em programas de melhoramento principalmente com espécies de propagação vegetativa e de longo período juvenil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

São abordados vários aspectos relacionados com a diferenciação de embriões nucelares (embriões) "in vitro" e "in vivo" e seu uso no melhoramento, principalmente através da indução de mutações. Considerações sobre a micropropagação a partir de ápices caulinares e gemas axilares, e a indução de calos de diversos explantes inclusive de segmentos do fruto, também farão parte desta revisão.

2.1. Poliembrionia

Muitas espécies e cultivares dos gêneros *Citrus* (incluindo *Poncirus* e *Fortunella*), *Mangifera* e *Syzygium*, possuem a característica de reproduzir-se agamicamente por apomixia do tipo agamospermia apospórica ou poliembrionia (MOREIRA *et alii*, 1947; FROST e SOOST, 1968; RANGAN *et alii*, 1969) formando vários embriões a partir da diferenciação de células individuais do nucelo. Os embriões normalmente se originam e se desenvolvem na extremidade micropilar do nucelo (MAHESHWARI e RANGASWAMY, 1958) projetando-se para dentro do saco embrionário, juntamente com o embrião (origem sexuada).

A extensão da poliembria é influenciada pela cultivar, estado nutritivo do fruto, fatores ambientais e cultivar polinizadora (FROST e SOOST, 1968). Tem sido encontrados de 1 a 40 embriões por nucelo (OHTA e FURUSATO, 1957). Uma espécie de limão foi autopolinizada e produziu quase exclusivamente plântulas nucleares; 46% das plântulas foram zigóticas quando polinizada por *Poncirus trifoliata* (CAMERON e SOOST, 1969).

A época de iniciação e desenvolvimento dos embriões tem ainda sido questionada. Há citações de que a iniciação "in vivo" coincide com a primeira divisão do zigoto (BACCHI, 1943), porém, em sementes de 'Ponkan' excisadas 47 dias após a polinização, foram encontrados embriões no estágio unicelulado, independentemente da presença do zigoto (ESEN e SOOST, 1977). SINGH (1963) encontrou embriões globulares em óvulos de *C. reticulata* cv. 'Nagpuri' com 55 dias, a contar da polinização, enquanto que não houve evidência da iniciação destes embriões em *C. aurantium* L., 100 a 120 dias após a polinização, quando o zigoto estava no estágio globular ou cordiforme (RANGAN *et alii*, 1969).

Polinização e fertilização foram consideradas um pré-requisito essencial para a embriogênese nuclear de citros (MAHESHWARI e RANGASWAMY, 1958; FROST e SOOST, 1968; BUTTON e BORNMAN, 1971), apesar de ter sido registrada a formação de sementes em *C. sinensis* Osb. e *C. paradisi* Macf. e, de embriões "in vitro" (BUTTON e BORNMAN, 1971; KOCHBA *et alii*, 1972) sem polinização. Há evidências de que com certos híbridos interespecíficos a polinização é definitivamente requerida (FROST e SOOST, 1968), ao passo que, algo menos claro é a necessidade da fertilização. A fertilização da célula-ovo deve ocorrer em 3 dias a 4 semanas após a polinização e, a

divisão do zigoto inicia-se logo a seguir. (SPIEGEL-ROY e KOCHBA, 1980).

Poliembrionia em citros é um carater recessivo e controlado por uma série de genes múltiplos (MAHESHWARI e RANGASWAMY, 1958), os quais podem regular a síntese de um potente inibidor da embriogênese (ESAN, 1973) em células nucelares de variedades monoembriônicas.

Teoricamente todas as plântulas nucelares seriam consideradas geneticamente idênticas à planta mãe (FROST e SOOST, 1968). No entanto, variabilidade fenotípica tem sido verificada tanto entre plantas de uma mesma cultivar como entre alguns padrões enzimáticos de plântulas derivadas de uma mesma semente (IGLESIAS *et alii*, 1974). Esta variabilidade tem sido atribuída à expressão da juvenilidade, polinização e fertilização e, à natureza quimérica de certas cultivares de citros (PARLEVLIET e CAMERON, 1959; BITTERS *et alii*, 1970).

Existe em citros um elevado grau de heterozigose devido a polinização cruzada, facilidade de mutações espontâneas e prevalectimento da poliembrionia. Genes recessivos são acumulados, tendo a poliembrionia um importante papel na diferenciação evolucionária (CAMERON e FROST, 1968).

Linhagens nucelares de citros são livres de vírus, mais vigorosas e usualmente de mais alta produção, e tem maior longevidade do que as árvores que lhe deram origem, embora em sua constituição genética sejam idênticas (BUTTON e BORNMAN, 1971).

O uso de nucelos como uma fonte de material livre de vírus teve sua importância reduzida, devido aos métodos mais recentemente desen-

volvidos de termoterapia e microenxertia "in vitro" (*MURASHIGE et alii*, 1972; *NAVARRO et alii*, 1975), que tem permitido a obtenção de plântulas isentas de viroses e sem as características de juvenilidade.

2.2. Embriogênese em tecidos nucelares

2.2.1. Embriogênese em nucelos

Considerando a tendência natural do nucelo formar embriões, a maioria da embriogênese artificialmente induzida em citros se dá neste tecido.

As primeiras tentativas para induzir a formação de embriões nucelares "in vitro" foram feitas por *RANGASWAMY* (1958, 1959, 1961). Foram obtidos embriões de variedades poliembriônicas, porém, na época da extração já haviam próembriões formados "in vivo".

RANGAN et alii (1968, 1969) e *BITTERS et alii* (1970) foram os primeiros a induzir embriogênese adventícia diretamente em tecidos nucelares excisados de sementes em desenvolvimento de cultivares monoembriônicas. Eles obtiveram embriões "in vitro" de diversas variedades (100 a 120 dias após a polinização), com o objetivo de produzir plantas livres de viroses. Embriões desenvolveram em um máximo de 20% dos explantes nucelares e originaram plantas.

Usualmente apenas 10 a 30% dos nucelos produzem embriões (*JUAREZ et alii*, 1976), embora tenha-se registrado próximo à 100% de sucesso com citron 'Ethrog' e limão 'Ponderosa' (*ESAN*, 1973). Este bom resulta

do foi obtido em nucelos com a extremidade chalazal embebida no meio, en quanto que em outras posições foram formados poucos embriões e calos de sorganizados.

A técnica da cultura de nucelos "in vitro" tem sido usada com sucesso para induzir embriões em uma série de cultivares monoembriônicas de muitas espécies cítricas (*RANGAN et alii*, 1968, 1969; *BITTERS et alii*, 1970; *DEIDDA*, 1973; *ESAN*, 1973; *JUAREZ et alii*, 1976). A formação de embriões é observada após 3-6 semanas de cultura na extremidade micropilar do nucelo. São produzidos de 1 à 12 embriões por explante e sua proliferação frequentemente ocorre por gemação.

Uma temperatura constante de 27°C e 16 horas diárias de luz a 1000 lux são adequadas para embriogênese nucelar (*ESAN*, 1973). Meio sólido foi superior ao meio líquido estacionário ou em agitação.

2.2.2. Embriogênese em óvulos

A cultura de óvulos fertilizados, não fertilizados ou abortivos se constitui em outra alternativa para a obtenção de plântulas nucleares "in vitro", principalmente em cultivares que não produzem sementes. Óvulos podem ser excisados de ovários de flores e frutos em desenvolvimento.

Óvulos fertilizados foram cultivados primeiramente por *MAHESHWARI e RANGASWAMY* (1958) e *RANGAN et alii* (1969).

Embriogênese "in vitro" tem sido obtida a partir de óvulos não fertilizados ou abortivos com diversas cultivares desde a época da po

linização (*BITTERS et alii*, 1970; *NAVARRO et alii*, 1979; *TUSA et alii*, 1983), algumas semanas após a ântese e, até 3 a 5 meses mais tarde (*BUTTON e BORNMAN*, 1971; *KOCHBA et alii*, 1972; *DEIDDA*, 1973; *ESAN*, 1973; *JUAREZ et alii*, 1976). Índices ótimos tem sido registrados em óvulos 6 semanas após a polinização para a cultivar 'Robertson' e 10 a 12 semanas para 'Temple' (*BITTERS et alii*, 1970), 6 a 8 semanas para 'Valência' e 'Marsh' com 44 e 68% de sucesso respectivamente (*KOCHBA et alii*, 1972) e 2 a 10 semanas com 68-80% de sucesso (*NAVARRO et alii*, 1979) em diversas cultivares.

Em alguns casos evidenciou-se a presença do zigoto, como exemplo em frutos de 100 a 120 dias (*DEIDDA*, 1973) e 13 a 15 semanas (*JUAREZ et alii*, 1976), o qual foi eliminado.

Os primeiros sinais de crescimento foram observados após 2 semanas através de uma excrescência na região da micrópila e em 4 a 5 semanas alguns embriões eram perfeitamente distinguíveis, cujo crescimento continuou até 8ª a 10ª semana (*DEIDDA*, 1973; *JUAREZ et alii*, 1976; *NAVARRO et alii*, 1979). A evolução do óvulo "in vitro" normalmente é mais lenta que a do nucelo, obtendo-se embriões até 15 semanas em cultura, sem qualquer crescimento prévio (*NAVARRO et alii*, 1979).

Frutos podem ser armazenados sob refrigeração (4°C) até 4 semanas sem afetar o potencial de sobrevivência e embriogênese do nucelo (*ESAN*, 1973; *NAVARRO et alii*, 1979).

A técnica da cultura de óvulos não fertilizados foi utilizada por *STARRANTINO e RUSSO* (1983) para introduzir as cultivares 'Newhal', 'Robertson' e 'Gillets' da Califórnia para a Itália. Os óvulos foram remo

vidos em condições assépticas e remetidos em frascos de vidro com gase.

O uso de óvulos inteiros é mais gratificante devido à sua facilidade de extração, quando comparada à tediosa extração do nucelo.

2.2.3. Embriogênese em calos nucelares

Muitos autores tem reportado o surgimento esporádico de pequenos calos em cultura de nucelos e óvulos, além dos embriões diferenciados diretamente (MAHESHWARI e RANGASWAMY, 1958; RANGASWAMY, 1958, 1961; SABHARWAL, 1963; BUTTON e BORNMAN, 1971; MITRA e CHATURVEDI, 1972; KOCHBA *et alii*, 1972; DEIDDA, 1973).

Na primeira tentativa de cultura de óvulos com sucesso (RANGASWAMY, 1958) foi obtida uma massa de pseudobulbilhos, termo empregado pela primeira vez por LA RUE (1954), citado por RANGASWAMY (1958), para designar as curiosas bolas de tecidos obtidas em cultura de gametófitos femininos de *Zamia*. Estes calos de citros compreendem nódulos compactos a esféricos de 0,1 a 1,0 mm de diâmetro, que variam de cor branca a creme, e que unidos entre si, dão ao calo uma estrutura porosa e friável.

Estudos de anatomia e desenvolvimento (BUTTON *et alii*, 1974), e aspectos fisiológicos (KOCHBA e SPIEGEL-ROY, 1973; KOCHBA e BUTTON, 1974) nestes tecidos, evidenciaram que praticamente qualquer célula é naturalmente embriogênica e, que os embriões se originam de células individuais. Estes pseudobulbilhos quando em condições adequadas podem evoluir formando proembriões e posteriormente plântulas (BUTTON *et alii*, 1974). Frequentemente há uma proliferação a partir de células superficiais ou do inte

rior dos proembriões.

A presença de corpúsculos globulares precedida pela formação de calos tem sido observada 3-4 semanas após a inoculação dos núcleos (*BUTTON e BORNMAN, 1971; KOCHBA e SPIEGEL-ROY, 1976a; JUAREZ et alii, 1976; STARRANTINO et alii, 1978*), a partir da região micropilar. Maior quantidade de embriões foi obtida de óvulos com 40-60 dias após a antese (*TUSA et alii, 1983*).

Estudos em microscopia eletrônica de calos de 'Shamouti' (*BUTTON et alii, 1974*) mostraram que estes tecidos compreendem pequenos proembriões globulares ou meristemóides (*TORREY, 1966*) em vários estágios de desenvolvimento e são desprovidos de tecido parenquimatoso desorganizado. Foram definidos em um dado tempo (*KOCHBA et alii, 1974*) embriões em 4 estágios a saber: I) globulares (1 mm); II) alongados (2-3 mm); III) cordiformes (3-5 mm, com cotilédones e primórdios de raiz); IV) com cotilédones bem desenvolvidos.

Culturas de óvulos não desenvolvidos extraídos de frutos maduros de algumas cultivares de citros foram efetuadas por *STARRANTINO e RUSSO (1980)*. Na ocasião, embriões estavam presentes e a partir deles houve proliferação com produção de calos friáveis e embriogênicos. Embriões foram obtidos de calos oriundos da parede do ovário não polinizado de duas espécies poliembriônicas (*MITRA e CHATURVEDI, 1972*) e de pedaços de óvulo não fertilizado de *C. aurantifolia*.

Observou-se diferenciação de pseudobulbilhos, proembriões e regeneração completa de planta a partir de células isoladas de calos for

mados em meio "MT", por maceração em agitador na presença das enzimas "ma_{cerase}" e "macerozyme" - 3 a 4% (BUTTON e BOTHA, 1975).

Desde que é difícil excisar proembriões jovens, métodos que permitem uma cultura com crescimento contínuo de pseudobulbilhos adquirem especial interesse, fornecendo uma fonte especial de embriões em qualquer época do ano. Devido à capacidade de reproduzirem o genótipo e também por serem livres de vírus, estes tecidos são de imenso valor aos melhoristas de citros. Há a possibilidade do isolamento de células a partir destas massas de tecido reprodutivo, as quais são consideradas semelhantes a ovos fertilizados para propósitos de morfogênese (RANGASWAMY, 1961).

2.2.4. Efeitos do meio de cultura

O meio normalmente utilizado na cultura de tecidos nucelares é o "MS" (MURASHIGE e SKOOG, 1962), com algumas modificações, principalmente as propostas por MURASHIGE e TUCKER (1969) - meio "MT".

2.2.4.1. Substâncias orgânicas complexas

O extrato de malte (EM)-500 mg/l foi adicionado em várias culturas promovendo embriogênese em nucelos e calos nucelares e proliferação de calos (RANGAN *et alii*, 1968, 1969; BITTERS *et alii*, 1970; BUTTON e BORNMAN, 1971; KOCHBA *et alii*, 1972; NAVARRO *et alii*, 1979) de muitas cultivares de citros, apesar de em alguns casos não ter mostrado efeitos positivos (RANGASWAMY, 1959; ESAN, 1973). Observou-se que os calos nucelares rapidamente perdem a dependência do EM para a embriogênese.

A formação de pseudobulbilhos foi estimulada por EM adicionado de AD - 25 a 40 mg/l (BUTTON e BORNMAN, 1971; KOCHBA e SPIEGEL-ROY, 1973; STARRANTINO *et alii*, 1978), produzindo embriões em até 37% das culturas. O EM, quanto aos seus efeitos sobre a embriogênese, pode ser substituído por AD (BUTTON e BORNMAN, 1971; KOCHBA e SPIEGEL-ROY, 1973), por ADS + Cin (MITRA e CHATURVEDI, 1972), ou por ADS + NAA + suco de laranja (RANGAN *et alii*, 1968, 1969; DEIDDA, 1973). A fração ativa do EM não é bem conhecida, mas, provavelmente, são incluídos um ou mais aminoácidos e possivelmente uma citocinina (VAN STADEN, 1974, citado por RANGAN *et alii*, 1969).

O suco de laranja não mostrou efeito sobre a embriogênese nucelar (ESAN, 1973), embora, pareça estimular o crescimento de calos de citros em alguns casos (MURASHIGE e TUCKER, 1969; THORPE *et alii*, 1971; ERNER *et alii*, 1975) e não em outros (BRUNET e IBRAHIM, 1973). A principal ação ativa, pelo menos com respeito ao crescimento de calos, parece ser o ácido cítrico (ERNER *et alii*, 1975).

O extrato de levedura apesar de não ter efeito sobre a embriogênese nucelar (ESAN, 1973) aumentou o desenvolvimento de órgãos em culturas de nucelos (RANGASWAMY, 1961; SINGH, 1963).

A caseína hidrolizada - 400 mg/l, separadamente ou em combinação com extrato de levedura ou cinetina - 2 mg/l, promoveu a formação de pseudobulbilhos e embriões (RANGASWAMY, 1958, 1961; SABHARWAL, 1963) e iniciação de calos, porém, às vezes não mostrou efeito algum (ESAN, 1973).

A água de côco tem sido amplamente usada em cultura de tecidos.

dos (*STEWART et alii*, 1970). Seu efeito benéfico foi demonstrado sobre a embriogênese em culturas nucleares (*BUTTON e BORNMAN*, 1971; *KOCHBA et alii*, 1972; *MITRA e CHATURVEDI*, 1972) e de células de citros (*BUTTON e BOTHA*, 1975) e, sobre o desenvolvimento normal de embriões globulares (*SABHARWAL*, 1963), apesar de ter sido observado um efeito detrimental sobre o crescimento de embriões originários de pseudobulbilhos (*RANGASWAMY*, 1961).

2.2.4.2. Vitaminas

Ótimos níveis de algumas vitaminas para proliferação de tecidos de citros foram estabelecidos por *MURASHIGE e TUCKER* (1969). *ESAN* (1973) evidenciou como essencial apenas a tiamina HCl - 10 mg/l e formação de pseudobulbilhos diretamente do tecido nucelar de *C. sinensis* cv. 'Washington Navel' foi estimulada por ácido ascórbico (*BUTTON e BORNMAN*, 1971).

2.2.4.3. Reguladores de crescimento

Auxinas e citocininas são claramente os compostos de maior significância na cultura de tecidos de plantas. *SKOOG e MILLER* (1957) mostraram que com um adequado balanço nos níveis destes dois fatores poder-se-ia estabelecer um controle sobre o crescimento e diferenciação das culturas "in vitro". Normalmente uma alta concentração de auxina e baixa de citocinina promovem o desenvolvimento de raiz e abundante proliferação de células com formação de calos, enquanto que, baixa concentração de auxina e alta de citocinina resulta na multiplicação de gemas.

O hábito de crescimento autônomo de calos indica um adequado nível endógeno de auxinas e possivelmente também de outras substâncias

de crescimento. A manipulação deste nível de auxina pode levar ao estímulo ou supressão da embriogênese.

A adição das auxinas IAA, NAA e 2,4-D ao meio de cultura, suprimiu significativamente ou completamente a embriogênese nucelar (ESAN, 1973), enquanto inibidores da síntese de auxinas como 7-azi-indol e 5-HNB, estimularam fortemente este processo (KOCHBA e SPIEGEL-ROY, 1977 b).

Citocininas aparentemente não essenciais (MURASHIGE e TUCKER, 1969; KOCHBA et alii, 1972; GRIMBLAT, 1972) aumentam a proliferação de pseudobulbilhos (RANGASWAMY, 1958). Isto tem sido observado com a adição de AD - 25 a 80 mg/l (KOCHBA e SPIEGEL-ROY, 1976a; STARRANTINO et alii, 1978) e BAP - 5 a 25 mg/l. Da descendência de um sô nucelo em meio com EM-500 + BAP - 20mg/l foram obtidas até 200 plântulas (STARRANTINO et alii, 1978).

Embriogênese em nucelo foi suprimida após aplicação de Cin, ADS e timidina (ESAN, 1973). Na presença de Cin a inibição aumentou com a concentração e, AG claramente estimulou a embriogênese, mesmo em concentração muito baixas - 0,001 mg/l (KOCHBA e SPIEGEL-ROY, 1977b). Embora AG tenha sido reportada possuir efeitos antagônicos sobre a atividade da citocinina, ela é também conhecida como um mutagênico e provavelmente tem outros metabólicos (LESCURE, 1973).

Auxinas e citocininas quando usadas juntas podem estimular a embriogênese (KOCHBA et alii, 1972; MITRA e CHATURVEDI, 1972). Melhores

calos nucelares foram crescidos em cinetina - 0,01 mg/l + IAA - 1,0 mg/l , ou apenas cinetina-1,0 mg/l (KOCHBA e SPIEGEL-ROY, 1973).

A embriogênese não parece ser estimulada pelo GA_3 (MITRA e CHATURVEDI, 1972; ESAN, 1973), e sim, foi fortemente suprimida quando aplicado de 1 a 30 mg/l. O efeito inibidor do GA_3 foi confirmado com o uso de dois inibidores da biossíntese do GA_3 (CCC e alar), que em concentrações superiores a 10 mg/l estimularam significativamente a embriogênese.

O surgimento de calos com subsequente organização em embriões foi influenciado por GA_3 , os quais posteriormente se tornaram habituais (KOCHBA et alii, 1972). A evolução de pseudobulbilhos em embriões foi estimulada por GA_3 nas várias doses testadas (10 - 100 mg/l), sendo que com 50 mg/l observou-se a formação de novos embriões a partir da superfície de pseudobulbilhos esféricos.

2.2.5. Efeitos de subcultivos

Uma vez estabelecidos os calos podem ser mantidos indefinidamente bem como seu potencial embriogênico, desde que sejam subcultivados em tempos adequados, uma vez que o intervalo entre passagens pode afetar o grau de desenvolvimento de embriões.

De modo geral, após um determinado número de subcultivos os calos se tornam habituais no que diz respeito às suas necessidades de auxinas e citocininas, fenômeno regular em cultura de tecidos nucelares de citros, sem perder a capacidade de produzir embriões.

Calos foram subcultivados a cada 4-5 semanas e após 8 passagens algumas linhagens se tornaram habituadas (*KOCHBA e BUTTON, 1974*), diferenciando embriões em 20-30% das culturas, com aproximadamente 1,5 embriões por cultura. Observou-se uma diferenciação de embriões 10 vezes maior com o envelhecimento dos calos por 6 semanas e 100 vezes por 14 semanas, quando comparados à subcultivos realizados a cada 3 semanas; isto foi atribuído a um decréscimo no teor de auxina com o envelhecimento (*GALSTON e DAVIES, 1969*). Calos envelhecidos por 20 semanas perderam o potencial embriogênico.

Maior produção de embriões foi obtida com subcultivos a cada 9 semanas em relação a 6 semanas, onde houve também produção de embriões e pseudobulbilhos, e 3 semanas, sem formação de embriões, porém, com a máxima proliferação de células. Após vários subcultivos de 3 semanas houve necessidade de 3-4 passagens a cada 6 semanas para que os calos recuperassem seu potencial embriogênico (*BUTTON e RIJKENBERG, 1977*).

2.2.6. Efeitos de irradiação

Calos nucleares foram submetidos à irradiação gama (0 a 32 kR) com uma intensidade de 3,1 kR/h (*SPIEGEL-ROY e KOCHBA, 1973a*) e concluiu-se que a diferenciação de embriões foi reduzida com doses inferiores a 2 kR e superiores a 20 kR e estimulada em 12-16 kR. As doses entre 28 e 32 kR foram letais. Houve evidência de uma correlação negativa entre diferenciação de embriões e proliferação de calos, esta última estimulada com doses inferiores a 2 kR e inibida principalmente com doses superiores a 16 kR.

Com uma intensidade de dose mais alta (50 kR/h), os mesmos autores observaram formação de apenas alguns embriões (2,6 contra 23,6 na testemunha) em doses superiores a 20 kR e, 24 kR foi letal. A dose de 16 kR foi testada em 100 kR/h havendo um efeito depressivo sobre o peso das culturas e número de embriões.

A irradiação tem sido reportada baixar os níveis de auxinas (CHOUREY *et alii*, 1973). Isto forneceria uma explicação sobre o estímulo a embriogênese fornecido pela irradiação (SPIEGEL-ROY e KOCHBA, 1980), quando as auxinas seriam reduzidas a um nível mais próximo do ótimo para diferenciação de embriões. Por outro lado, pode-se considerar que explantes subcultivados contêm vários estágios de desenvolvimento, desde células isoladas até corpúsculos globulares e embriões de diversos tamanhos. Espera-se que células individuais e agregados menores sejam mais sensíveis à irradiação permitindo estágios embriogênicos maiores e mais desenvolvidos e resultando no aparecimento de mais embriões. Isto poderia explicar pelo menos em parte a variação aumentada na resposta de culturas individuais com calos em envelhecimento usados para subcultivos (KOCHBA e SPIEGEL-ROY, 1977b).

Irradiação de calos a 16 kR com intensidade de 3,1 kR/h mostrou um efeito mais depressivo sobre o peso das culturas do que a irradiação do meio. O número de embriões foi o mesmo, irradiando ou não os calos. O aumento no número de embriões foi similar com irradiação dos calos e, com irradiação dos calos e do meio (SPIEGEL-ROY e KOCHBA, 1973b).

A irradiação de certos componentes do meio pode reduzir dras

ticamente o peso das culturas e a capacidade para diferenciação de embriões, como observado com irradiação do meio adicionado de adenina (20, 40 e 80 mg/l). Em meio suplementado com altas doses de cinetina (1 mg/l) e IAA (1 mg/l) o peso das culturas foi baixo e não houve formação de embriões com ou sem irradiação; por outro lado, com baixas concentrações de cinetina (0,1 mg/l) e IAA (0,1 mg/l) a irradiação diminuiu o crescimento dos calos, porém, estimulou notavelmente a diferenciação de embriões.

A adição de IAA não irradiado ao calo irradiado resultou num fenômeno dependente de dose. Enquanto em baixas doses de irradiação (menos que 8 kR) a embriogênese foi inibida pelo IAA, a inibição foi gradualmente superada por doses mais altas que 8 kR (*KOCHBA e SPIEGEL-ROY, 1977b*). Algumas doses de irradiação (12-16 kR) juntamente com níveis de IAA ainda estimularam a embriogênese e aumentaram a taxa de desenvolvimento de embriões. Usualmente doses letais (30 kR) ainda permitiram sobrevivência e crescimento de culturas na presença de IAA (*KOCHBA e SPIEGEL-ROY, 1977b*). *SPIEGEL-ROY e KOCHBA (1980)* postularam que com certas doses de irradiação a auxina é reduzida a níveis sub-ótimos. O IAA adicionado promoveria então embriogênese, como de fato foi observado.

2.2.7. Desenvolvimento de embriões

Embriões raramente germinam se são deixados unidos ao núcleo, calos ou outros embriões. Uma vez atingido o tamanho de 3-6 mm necessitam ser individualizados em novo meio, para que tenha continuidade o processo de desenvolvimento (*BUTTON e BORNMAN, 1971; KOCHBA et alii, 1972; NAVARRO e JUAREZ, 1977*).

Com a individualização há uma proliferação dos embriões pelo processo de gemação (ESAN, 1973), na maioria dos casos a partir de seus hipocótilos ou células superficiais (RANGASWAMY, 1961; BITTERS *et alii*, 1970; KOCHBA *et alii*, 1972).

Normalmente a formação de plântulas a partir dos embriões é precedida primeiro pela formação de raízes e depois da parte aérea. Ocorrendo o contrário há uma inibição do desenvolvimento das raízes. Embriões com 4-10 mm emitem raiz dentro da 1ª e 2ª semanas e parte aérea dentro da 3ª e 4ª semanas após a individualização (NAVARRO *et alii*, 1979).

A incorporação de GA_3 - 1 mg/l aumenta o desenvolvimento de raízes em embriões plenamente (RANGASWAMY, 1961; BUTTON e BORNMAN, 1971; KOCHBA *et alii*, 1972) e parcialmente desenvolvidos (KOCHBA *et alii*, 1974), enquanto que hormônios usualmente conhecidos como estimulantes do enraizamento, a exemplo do NAA e IBA, o suprimem (KOCHBA e SPIEGEL-ROY, 1976b).

GA_3 - 1 mg/l acrescido de adenina - 27 mg/l promoveu o enraizamento de 80% dos embriões globulares (1 mm) e alongados que não apresentavam radícula. Embriões cordiformes (3-5 mm) com radícula parcialmente desenvolvida enraizaram em 83% dos casos, enquanto que com cotilédones bem desenvolvidos o sucesso foi total. O desenvolvimento de pseudobulbilhos alongados pode ser consideravelmente aumentado com GA_3 - 10 a 50 mg/l + ADS - 54 mg/l (NAVARRO *et alii*, 1979).

O papel do GA_3 não está muito claro uma vez que não é considerado um fator principal na indução de raízes. Seus efeitos são explica

dos por duas hipóteses: 1) promove o desenvolvimento ontogenético natural dos embriões sem primórdio radicular àqueles com primórdio, que então desenvolvem raízes na ausência de substâncias exógenas de crescimento e, 2) proporciona diretamente a iniciação de uma zona meristemática radicular e ou estimula o desenvolvimento de uma zona radicular existente (KOCHBA *et alii*, 1974).

Diversas combinações auxina/citocinina foram testadas para o desenvolvimento de embriões (KOCHBA *et alii*, 1972), indicando melhores resultados a combinação cinetina - 0,1 + IAA - 1,0 mg/l para a cv. 'Valência'. Esta relação favoreceu a formação de raízes, porém, inibiu a elongação dos caules. Ambos os órgãos tiveram um desenvolvimento de modo geral favorecido em cinetina - 1,0 + IAA - 0,1 mg/l. Com IAA - 0,1 mg/l se obteve 34% de enraizamento para 'Shamouti' e 41% para 'Marsh'.

2.2.8. Variação somaclonal

Inúmeras referências tem surgido sobre a instabilidade genética de tecidos de plantas em cultura. As variações mais comumente observadas são alterações no número de cromossomos (poliploidia e aneuploidia), quebras de cromossomos e fragmentações nucleares, mutações de ponto e variações epigenéticas. Estas modificações podem pré-existir nos tecidos das plantas ou serem induzidas por diversos fatores como intensidade luz, temperatura, tempo de subcultivo e principalmente determinados componentes do meio, a exemplo do 2,4-D.

Alterações como anisocotilia, pluricotilia, sincotilia, cotilédones fasciados, alongados e corrugados, cotilédones de diferentes ta

manhos, embriões com mais de 2 cotilédones e vários graus de fusão entre embriões, tem sido observadas em embriões oriundos tanto diretamente do nucelo como através da formação de calos ou pseudobulbilhos (DEIDDA, 1973; JUAREZ *et alii*, 1976; NAVARRO e JUAREZ, 1977; STARRANTINO *et alii*, 1978). Porém, na maioria dos casos, embriões anormais dão origem a plantas normais (NAVARRO *et alii*, 1979).

Uma observação detalhada de plantas em casa de vegetação obtidas por cultura de núclos revelou que 20% tem caracteres anormais na folha (JUAREZ *et alii*, 1976), como folhas em forma de coração, arredondadas, onduladas ou com 2 folíolos. STARRANTINO *et alii* (1978) também observaram anomalias tais como pecíolos fasciados, folhas deformadas e pecíolos e internós retorcidos.

Procurando-se fazer uma relação entre a origem dos embriões (nucelo, calo e gemação) e a frequência das alterações, concluiu-se que as modificações não estão ligadas ao processo de embriogênese, uma vez que nos casos em que se obteve mais de uma planta a partir do nucelo ou calo, todas apresentavam características idênticas. As modificações devem estar relacionadas à planta mãe, variadas formas de gemação e formação do óvulo (JUAREZ *et alii*, 1976).

Nenhuma variação em número de cromossomos tem sido detectada em plantas regeneradas a partir dos calos friáveis constituídos por corpúsculos globulares obtidos em culturas nucelares de citros. Esta aparente estabilidade genética pode ser devida à natureza destes calos. Diferentes da maioria dos calos de plantas, que são formados predomi-

nantemente por células grandes, vacuoladas e parenquimatosas, com células embriogênicas apenas ocasionais, estes calos de citros compreendem células pequenas e densas, parecendo que todas são embriogênicas. Eles são considerados como uma massa de proembriões, em vários estágios de desenvolvimento, proliferando (*BUTTON et alii*, 1974). O fato de que calos de citros são habituados e não requerem fontes exógenas de reguladores de crescimento, provavelmente também contribui para sua estabilidade.

2.3. Melhoramento das espécies cítricas

2.3.1. Métodos convencionais

Uma grande variabilidade existe dentro de *Citrus* e gêneros estreitamente relacionados, frequentemente interférteis. No entanto, algumas barreiras como apomixia, esterilidade gamética e incompatibilidade impedem sua plena utilização. O melhoramento por hibridação só é então efetivo quando se usa como progenitor feminino uma cultivar monoembriônica, o que não é possível com cultivares que não produzem sementes (*BUTTON e BOTHA*, 1975; *SPIEGEL-ROY e KOCHBA*, 1980).

Os embriões nucelares estão localizados numa situação privilegiada sob o ponto de vista nutricional e iniciam a divisão celular primeiro, impedindo o pleno desenvolvimento do zigoto (*BUTTON e BOTHA*, 1975).

2.3.2. Cultura de embriões "in vitro"

Quando há necessidade do uso de um progenitor feminino que seja poliembriônico, o desenvolvimento do zigoto pode ser assegurado através de seu cultivo "in vitro".

Cultura de embriões excisados de cultivar. poliembriônica (*C. aurantium*) 100-120 dias após a polinização, foi feita com sucesso por *RANGAN et alii* (1969). Estes já em forma globular ou cordiforme se desenvolveram em embriões maduros e mais tarde em plântulas. Sua identificação foi assegurada tomando-se sementes oriundas do cruzamento com *Poncirus trifoliata* L., cujas folhas trilobadas são um caráter dominante, úteis como marcador genético de sua descendência (*CAMERON e FROST, 1968*). Nesta fase ainda não se encontraram embriões nucelares.

Embriões de sementes imaturas de 'Satsuma' (*C. unshiu* Marc.) polinizada por *P. trifoliata* L., mostraram um bom desenvolvimento se isolados aos 90 ou 120 dias após a polinização e cultivados em meio "MS" mais suco de pepino - 20% (*HORIUCHI et alii, 1976*).

É vital a distinção entre a descendência zigótica e a nucelar em estágios precoces, o que poderia ser resolvido com marcadores genéticos seguros que expressassem características morfológicas claramente definidas, como é o caso da folha trilobada em *P. trifoliata*. No entanto, este caráter está sob controle monogênico e muitas plantas são heterozigotas (*IGLESIAS et alii, 1974*) e, de qualquer modo, o pólen marcador teria que ser substituído por aquele do progenitor desejado.

Uma tentativa tem sido feita para distinguir plântulas nucleares de zigóticas em progênes híbridas de citros, através da análise infravermelha de óleos essenciais nas folhas (*PIERINGER e EDWARDS, 1965*) ou morfologia das folhas das progênes (*TEICH e SPIEGEL-ROY, 1972*).

Métodos bioquímicos tem sido desenvolvidos, como análise de

flavonóides (TATUM *et alii*, 1974, 1978), acastanhamento enzimático devido a polifenóis (ESAN e SOOST, 1976), hidrocarbonos de cadeia longa e, isoenzimas peroxidases e esterases (ESEN e SOOST, 1976; BUTTON *et alii*, 1976; SPIEGEL-ROY e KOCHBA, 1977). Apesar de algumas limitações devido à variabilidade genética dos progenitores, as isoenzimas peroxidase e esterase tem sido analisadas em plântulas com 20 dias "in vitro" e oferecem boas perspectivas para ajudar o melhorista de citros a selecionar plântulas zigóticas nos primeiros estágios de desenvolvimento das progênies (IGLESIAS *et alii*, 1974).

2.3.3. Uso de protoplastos

O isolamento de protoplastos com posterior regeneração de plântulas, dentre as fruteiras, foi estabelecido pela primeira vez com citros (VARDI *et alii*, 1975). Plântulas foram regeneradas de protoplastos isolados de calos nucelares de duas cvs. de laranja ('Nucellar Shamouti' e 'Shamouti Landau'), tres de tangerina ('Murcott', 'Dancy' e Ponkan'), uma de 'Grapefruit' ('Duncan'), uma de *C. aurantium* e limão ('Villafranca') (VARDI e SPIEGEL-ROY, 1982).

Este sistema pode servir tanto para futuros estudos genéticos da célula, como ser aplicado ao melhoramento dos citros induzindo mutações pelo tratamento dos protoplastos com agentes mutagênicos e através da hibridação somática inter e intraespecífica. Uma vez assegurada a regeneração de plântulas a partir de protoplastos, caracteriza-se a potencialidade dos citros para a aplicação das técnicas de engenharia genética.

2.3.4. Indução de mutações

O melhoramento genético em citros tem sido devido, em grande parte, à seleção de mutantes ocorrendo naturalmente (CAMERON e FROOST, 1968). São citados muitos casos de novas variedades desenvolvidas a partir de mutações de gemas (CAMERON e SOOST, 1969; HENSZ, 1972). O uso de agentes mutagênicos forneceria uma valiosa técnica para aumentar a frequência de mutações, e pode, eventualmente, se tornar tão importante quanto os esforços de melhoramento pelos métodos convencionais (SPIEGEL-ROY e KOCHBA, 1973a, 1975).

2.3.4.1. Irradiação de tecidos multicelulares

Uma mutação é um evento em uma única célula, a qual se é meristemática dará origem a uma linhagem de células mutadas, enquanto as células adjacentes permanecem invariáveis. A mistura de células geneticamente diferentes (quimera) raramente pode ser evitada quando órgãos multicelulares tais como sementes ou gemas são submetidos a tratamentos mutagênicos. Dependendo da proporção e tamanho da linhagem de células mutadas em um órgão como um ramo formado de gema lateral, a expressão fenotípica do caráter mutante é propenso à instabilidade.

Além do mais, devido à perda de vigor causada por muitas mutações, a linhagem de células mutadas tende a ser mascarada pelo tecido normal e, então, nunca vem a ser expressa, um fenômeno denominado seleção diplôntica. A seleção recorrente de gemas tem sido designada para resolver quimeras e superar a perda de mutações por seleção diplôntica, porém, ainda que com algum efeito é trabalhosa e cara (NYBOM, 1970; KOCHBA et alii,

1980).

2.3.4.2. Irradiação de tecidos nucelares

A origem dos embriões é de fundamental importância para que a cultura de tecidos possa ser associada às técnicas de indução de mutações. Eles precisam ser derivados de células individuais e não de centros meristemáticos semelhantes à gema, para permitir o desenvolvimento de mutantes sólidos após tratamentos mutagênicos.

A perda de mutações por formação de quimeras e seleção diploítica seria efetivamente superada aplicando o tratamento mutagênico à primeira célula destinada a dar origem a uma planta, como é o caso do nucelo em um estágio que antecede a diferenciação dos embriões. Assim sendo, a cultura de óvulos e nucelos de cultivares de citros pode ser de grande importância, uma vez que embriões se originam de uma única célula e que plantas viáveis são posteriormente estabelecidas (*BUTTON e KOCHBA, 1977*). Entretanto, nucelos no estágio adequado de desenvolvimento são disponíveis em período curto, sua extração é tediosa e, é baixo o número de plantas formadas.

Experimentos foram desenvolvidos com nucelos de óvulos não fertilizados e não diferenciados de 'Shamouti' (*SPIEGEL-ROY e KOCHBA, 1973b*), extraídos 4 semanas após a antese e irradiados por ocasião da inoculação e, 2 e 4 semanas depois. A percentagem de culturas com sucesso foi maior com irradiação após 2 semanas da inoculação. O número médio de embriões por cultura foi um tanto mais alto que a testemunha nas doses de 0,5 e 1,0 kR em culturas irradiadas por ocasião da inoculação ou 4 semanas depois.

2.3.4.3. Irradiação de calos nucelares

As vantagens da cultura de tecidos e células para indução e seleção de mutantes tem sido amplamente revisadas (MELCHERS, 1972; BOTTINO, 1975; SPIEGEL-ROY e KOCHBA, 1977). A manipulação de um grande número de células/genótipos em um espaço limitado é atrativa, comparada com a demanda de espaço no melhoramento convencional.

Um calo embriogênico subcultivado pode ser usado efetivamente e independentemente de restrições sazonais. A capacidade para embriogênese tem sido demonstrada se manter mesmo após 8 anos de subcultivos (BUTTON *et alii*, 1974). A origem unicelular de embriões que se desenvolvem nos calos nucelares da cultivar 'Shamouti' (*C. sinensis*), foi evidenciada por BUTTON *et alii* (1974) em estudos de microscopia eletrônica, com posterior regeneração de plantas.

Trabalhos tem sido desenvolvidos (KOCHBA *et alii*, 1980) com o uso de raios gama (8, 12 e 16 kR a 80 kR/h) sobre calos nucelares, obtendo tolerância a níveis mais elevados de NaCl e 2,4-D. Calos de 'Shamouti' foram expostos a irradiação gama (12 kR), transferidos para meio contendo NaCl-0,2 M, dos quais se obteve colônias de células capazes de crescer na presença de NaCl nesta concentração (BEN-HAYYIM e KOCHBA, 1982).

Células isoladas foram obtidas a partir de calos (BUTTON e BOTHA, 1975), as quais podem ser sujeitas a tratamentos mutagênicos, abrindo a possibilidade de aplicar métodos usados na seleção de mutantes em microrganismos (DEVREUX, 1973; HEINZ, 1973). Células mutantes se reorganizam em plantas inteiras em que todas as células seriam portadoras da mutação.

ção.

Tem-se à mão para citros um sistema "da célula à planta" e seu uso para o melhoramento teria grande impacto com respeito ao estabelecimento de novas cultivares de valor. Desde que agora se tem possibilidade de manusear qualquer número de células (genótipos), algumas das limitações presentes ao melhoramento das fruteiras seriam superadas.

2.3.4.4. Agentes mutagênicos em protoplastos

Protoplastos isolados de calos obtidos de óvulos não fertilizados foram tratados com etil metano sulfonato (EMS) e raios X (*VARDI et alii*, 1975). A irradiação com 1.500 R não diminuiu significativamente o número de colônias. Metade da sobrevivência foi atingida em torno de 3.400 R. Somente 14% das colônias desenvolveram após o tratamento com 6.000 R, quando comparadas à testemunha. Irradiação X (4.500 a 7.500 R) promoveu a diferenciação de embriões, o que não se verificava em protoplastos não irradiados. Exame citológico mostrou que estes calos se mantiveram consistentemente diplóides ($2n = 18$).

Colônias altamente embriogênicas foram obtidas a partir de protoplastos isolados e irradiados (*VARDI e SPIEGEL-ROY*, 1982), o que favorece a suposição de um efeito direto da irradiação sobre as células.

2.3.4.5. Agentes mutagênicos em plântulas decapitadas

Plântulas decapitadas na presença de alta umidade relativa formam calos na superfície do caule, originando gemas adventícias. Plântulas com aproximadamente 5 cm de altura e 4 folhas foram submetidas a ra

dição gama (0 a 8 kR). Somente 15% das plântulas geraram novas gemas em 4 kR e, 8 kR foi letal. O método prestar-se-ia bem para a produção de mutantes sólidos e é também mais fácil que a cultura "in vitro" (*SPIEGEL-ROY e KOCHBA, 1973a*).

Gemas adventícias e embriões globulares são formados em plântulas nucleares "in vitro" na presença de NAA-1,0 mg/l + BA-5,0 mg/l. A região intermediária entre a raiz e a parte aérea de *P. trifoliata* foi tratada com EMS-0,3% e transplantada para meio contendo NaCl-0,2M (*MATSUMOTO, 1983*). Foram obtidas linhagens com vários graus de tolerância ao NaCl.

2.3.4.6. Seleção de mutantes

A análise genética de populações F_1 e F_2 de plantas férteis de citros, obviamente seria difícil devido à prolongada fase juvenil e por causa da poliembrionia. Mas, uma vez regenerada uma planta mutante desejável e estável, se ela representa uma mutação sólida ou uma variação epigenética na expressão gênica, ela pode ser mantida e multiplicada por propagação clonal.

A utilização do valor potencial de cultura de células para seleção de mutantes se defronta com consideráveis dificuldades. Métodos efetivos de seleção para a detecção precoce e isolamento de mutantes desejáveis precisam ainda ser desenvolvidos.

Um sistema de seleção com sucesso potencial pode agir a um nível celular. Expressões fenotípicas dependentes de características estruturais e funcionais de um órgão inteiro da planta, a exemplo de certos

tipos de resistência a doenças ou herbicidas, tão bem como mutantes auto e auxotróficos (*WHIDHOLM, 1978*), seriam selecionados somente se coincidem com processos definidos a um nível celular ou de genes.

Estão em estudo para citros sistemas modelos de seleção para resistência a salinidade, estreptomicina e herbicidas (*KOCHBA e SPIEGEL-ROY, 1982*). Mutantes para outras características, tais como hábitos de crescimento e frutificação teriam que ser selecionadas num estágio posterior de desenvolvimento.

2.4. Propagação vegetativa "in vitro"

2.4.1. Micropropagação

Uma vez identificado um mutante com características de interesse, este precisa ser multiplicado em grande escala e rapidamente, o que é possível com o uso das técnicas de cultura de tecidos. A similaridade na resposta entre gemas crescidas "in vivo" e "in vitro" é significativa, o que permite também o estudo "in vitro" de fatores que controlam fenômenos complexos tais como diferenciação e desenvolvimento de gemas florais (*ALTMAN e GOREN, 1977*).

A micropropagação nas espécies cítricas pode ser feita "in vitro" através da cultura de ápices caulinares e gemas axilares, desde que lhe sejam propiciadas condições ideais, principalmente no que diz respeito a meio de cultura.

Anteriormente a remoção dos explantes, procede-se uma cuidadosa assepsia dos ramos (*GILADI et alii, 1979*), através de imersão em et

no 1-80% por 5 minutos e posteriormente, em hipoclorito de cálcio filtrado -9% adicionado de "tween" 20-0,01%, por 20 minutos. Este procedimento se prende ao fato de que as plantas no pomar são altamente sujeitas a contaminação por bactérias e fungos, que podem estar profundamente localizados nos tecidos e que, quando em presença de um meio nutriente enriquecido, seu desenvolvimento é acelerado a um grau que pode interferir com a resposta do explante.

Um bom desenvolvimento de gemas latentes foi obtido em meio "MS" adicionado de cinetina + NAA-1,0 mg/l (BOUZID, 1975). Uma gema de *C. grandis* cultivada em meio "MS" modificado por CHATURVEDI e MITRA (1974) e suplementado por BA-0,25 + NAA-0,1 mg/l, produziu 20-30 novas gemas e todas desenvolveram brotos.

Diversos reguladores de crescimento foram adicionados ao meio "MT" (ALTMAN e GOREN, 1977), no qual foram inoculadas gemas extraídas de árvores adultas cultivadas em pomar e jovens em casa de vegetação. O IAA atrasou a brotação e aumentou levemente a elongação, enquanto que GA₃ promoveu a elongação dos internós. BA e cinetina induziram a formação de mais que 6 gemas adventícias em lugar de 2 que normalmente desenvolvem. A desfolhação da planta antes da coleta das gemas estimulou o crescimento "in vitro" de novos brotos.

Âpices caulinares de *C. microcarpa* Bunge mesmo com menos de 1 mm, cultivados em meio "White" suplementado por adenina-40 mg/l ou leite de côco-40% (v/v), se alongaram e produziram folhas dentro de 4 semanas. Âpices maiores que 1 cm cresceram mais rápido sobre meio "White" acrescido

de adenina-40 mg/l ou IAA-5 mg/l (RANGASWAMY, 1975).

Nós e entre-nós com menos de 1 cm de ramos jovens e adultos de diversas cultivares foram inoculados em meio sólido ("MS" com BA-2,0 mg/l) e ápices caulinares em meio líquido ("MS" integral ou 1/2 da concentração adicionado de BA - 0,5 a 2,0 mg/l), e mantidos à luz por 15 hs a 27°C e 9 hs no escuro a 20°C (BARLASS e SKENE, 1982). Os ápices evidenciaram um crescimento muito modesto. Os entre-nós de plântulas jovens produziram ramos prontamente, porém, nos adultos não houve crescimento. A mais prolífica fonte de brotos para todas as variedades foram as gemas axilares dos nós, tanto jovens quanto adultos.

2.4.2. Indução de calos em segmentos da planta

Calos tem sido obtidos em meio "MS" ou "MT" a partir de segmentos de folha, caule e ápices caulinares de *C. paradisi* Macf. com adição de NAA-0,5 mg/l (ALTMAN e GOFEN, 1971; BHANSALY e ARYA, 1978), de *C. grandis* com cinetina-0,25 + NAA-2,5 + 2,4-D-0,25 mg/l (CHATURVEDI e MITRA, 1974), de *C. limettioides* adicionado de 2,4-D-0,25 mg/l + BA-0,1 ou 1,0 mg/l (BHANSALY e ARYA, 1979).

O meio "White" suplementado por 2,4-D-5 mg/l produziu calos em ápices caulinares de *C. microcarpa* Bunge. Neste mesmo meio adicionado de caseína hidrolizada-400 mg/l ou cinetina-0,02 mg/l, a base da folha também produziu calos, porém, sem organogênese. Houve formação de calo na extremidade de plântulas decapitadas e crescidas "in vitro" sobre o meio "Tukey" (RANGASWAMY, 1975).

2.4.3. Organogênese em calos

Citocininas, de modo geral, aumentam o estímulo à formação de gemas adventícias (GRIMBLAT, 1972; MITRA e CHATURVEDI, 1972).

Melhores resultados na organogênese de calos, com até 30 brotos por explante, tem sido obtidos em meio "MT" adicionado de BAP-0,5 + NAA-0,15 + EM-1000 mg/l para *C. paradisi* Macf. (ALTMAN e GOREN, 1974) e de BA-10 + NAA-0,1 + EM-500 mg/l para *C. madurensis* (GRIMBLAT, 1972); em meio "MS" adicionado de BAP-1,0 + cinetina-0,25 mg/l, ou BAP-1,0 + cinetina-0,25 + IAA-0,2 mg/l, ou BAP-0,5 + cinetina-0,25 + NAA-0,2 + EM-500 mg/l para *C. limettioïdes* (BHANSALY e ARYA, 1979); em meio "MS" modificado por CHATURVEDI e MITRA (1974) com metade da concentração de vitaminas, suplementado por BA-0,25 mg/l, ou BA-0,25 + NAA-0,1 + EM-500 mg/l para *C. grandis* (BHANSALY e ARYA, 1979).

Houve diferenciação de gemas em todas as combinações de BA (0,1 a 10 mg/l) + NAA (0,1 a 0,2 mg/l) + EM (500 e 1000 mg/l). A formação de gemas, brotos e embriões foi estimulada pela adição de zeatina-0,1 a 0,3 mg/l ao meio (CHATURVEDI e MITRA, 1974; CHATURVEDI et alii, 1974).

2.4.4. Enraizamento dos brotos

Após a diferenciação das gemas e alongação dos brotos, estes são separados e transferidos para meio de enraizamento.

Brotos obtidos de calos de *C. grandis* (CHATURVEDI e MITRA, 1974) menos vigorosos enraizaram em meio "MS" modificado e adicionado de NAA-0,1 mg/l, enquanto que os mais vigorosos requereram NAA-0,5 ou NAA-0,25 mg/l + IBA. Primórdios de raiz foram visíveis com 10-30 dias de incubação.

Rizogênese de brotos oriundos de calos de *C. limettioides* só ocorreu quando estes foram excisados e colocados em meio "MS" com NAA-0,1 a 2,5 mg/l + cinetina-0,1 mg/l + sacarose-2% (BHANSALY e ARYA, 1979). Brotos com mais de 1 cm obtidos "in vitro" por BARLASS e SKENE (1982) a partir de nós, entre-nós e ápices caulinares de diversas variedades, enraizaram em meio "White" com altos níveis de auxina (NAA-1,8 a 4,6 mg/l).

Uma única raiz foi produzida a partir de ápices caulinares de *C. microcarpa* Bunge cultivados em meio "White", adicionado de adenina -40 mg/l ou IAA-5 mg/l (RANGASWAMY, 1975), enquanto em segmentos internos houve a produção de 2-4 raízes por explante. O primeiro par de folhas de plântulas crescidas "in vitro" foi excisado e cultivado sobre meio "White" suplementado por IAA-5 mg/l, diferenciando 2 raízes na base da folha durante a 1ª semana e, em 10 dias, as raízes foram proeminentes.

2.5. Cultura de segmentos do fruto

Calos derivados de tecidos de frutos permitem estudos de fenômenos morfológicos, citológicos e fisiológicos (SCHROEDER e SPECTOR, 1957; SCHROEDER et alii, 1962; KORDAN, 1963, 1965).

É possível se investigar a biossíntese de óleos essenciais no flavedo (BRUNET e IBRAHIM, 1973) eo fundamento básico do acúmulo de açúcares e ácidos.

O enrugamento de frutos cítricos, por exemplo, é devido a expansão continuada e excessiva do endocarpo após ter cessado a divisão celular do mesocarpo (albedo) causando sua ruptura, o que torna o fruto par-

ticularmente sensível à infecções de fungos e bactérias. Tem sido mostrado (GILFILLAN *et alii*, 1974) que pulverizações de GA_3 podem reduzir grandemente a incidência de enrugamento, possivelmente devido a promoção da divisão celular pelo GA_3 , como anteriormente descrito por SCHROEDER e SPECTOR (1957) em um sistema "in vitro".

A cultura de tecidos pode fornecer um adequado instrumento de estudo de respostas morfológicas e desequilíbrios nutricionais. Por exemplo, foi criado por BAR-AKIVA *et alii* (1974) um modelo "in vitro" para tentar resolver o problema da "casca grossa" causada por altos níveis de potássio (K). Observou-se que baixos níveis de K foram associados a altas concentrações de putrescina e vice-versa. Adicionando putrescina no meio com elevada concentração de K, foi possível reduzir grandemente a proliferação de calos da casca. Quando putrescina foi aplicada em pomares onde K provocava "casca grossa" observou-se uma acentuada redução do problema.

Proliferação de calos a partir de albedo foi obtida no meio "White" adicionado de IAA-5 mg/l (RANGASWAMY, 1961) e aumentada pela adição de glicina-2 a 4 mg/l (MURASHIGE e TUCKER, 1969).

Foram observados efeitos significativos do suco de laranja -10% adicionado ao meio "MT" sobre o crescimento de calos de albedo na cultivar 'Shamouti' e *C. limon* Burm.f., e ao meio "MS" em *C. limon* Burm.f., *C. medica* e *C. reticulata* Blanco (MURASHIGE e TUCKER, 1969). O ácido cítrico-2 mg/l, que é o componente natural do suco de laranja, mostrou poder substituir pelo menos em parte a atividade promotora de crescimento do suco de laranja, parecendo ser responsável pela maior parte da atividade de

crescimento do suco (ERNER *et alii*, 1975).

Segmentos de albedo (20 mg) foram cultivados "in vitro" (EINSET, 1978) sobre meio "MS" adicionado de 2,4-D + cinetina-0,5 mg/l + suco de laranja lima centrifugado, mantidos no escuro. Em *C. medica*, IAA e GA₃ mostraram um efeito sinérgico na proliferação de calos (SCHROEDER e SPECTOR 1957); afirma-se que a capacidade para proliferar é comum ao pericarpo maduro de quase todas as espécies frutíferas subtropicais lenhosas (LETHAN, 1958; SCHROEDER *et alii*, 1962).

Bom crescimento de calos oriundos de vesículas foi observado com a adição de 2,4-D (1,0 mg/l) e a citocinina SD 8339 (10 mg/l) ao meio "N₁" para *C. limon* Burm.f., *C. sinensis* Osb. e *C. reticulata* Blanco (NITSCH, 1965). Resultados positivos também se evidenciaram em meio "White" adicionado de EM-0,5% ou GA₃-2 mg/l (RANGASWAMY, 1961).

Calos foram induzidos a partir de vesículas de *C. acida* em meio "MS" acrescentado de cinetina-1,0 mg/l + IAA-10 mg/l (PAREKH e METHA, 1970) e de *C. sinensis* cv. 'Valência' com cinetina-1,0 mg/l + IAA-2,0 mg/l (UNGER e FENG, 1978), mantidos à luz. A adição de cinetina-0,5 mg/l + 2,4-D-2,0 mg/l + suco de laranja lima-10% também permitiu a formação de calos. O suco de laranja aumentou significativamente o crescimento de calos em *C. medica*, *C. limon* Burm.f., *C. paradisi* e *C. sinensis* Osb. (MURASHIGE e TUCKER, 1969).

Formação de calos a partir de vesículas de frutos maduros e imaturos também foi verificada em *C. hassaku*, Hort. ex Tanaka (KATO, 1980), em meio "MS" acrescido de IAA-1,7 + BA-0,4 mg/l, ou IAA-1,7 + cinetina-0,4 mg/l, ou 2,4-D-0,6 + 2iP-1,5 mg/l, ou ainda 2,4-D-0,6 + cine

tina-0,4 mg/l. Alguns calos mantidos por 15 semanas sem subcultura pesa ram em médio 1,4 g e mediram 10-15 mm de diâmetro. Ácido cítrico e ácido málico inibiram completamente a proliferação.

Em nenhum meio de cultura se conseguiu regeneração de plan tas a partir de calos de albedo e vesículas.

2.6. Remoção das plantas para o solo

Plantas obtidas tanto por embriogênese como por organogêne se podem ser levadas ao solo quando apresentarem 3-4 pares de folhas. Al tas perdas ocorriam durante este processo de transplante dos tubos de en saio para o solo (SINGH, 1963; BITTERS *et alii*, 1970; BUTTON e BORNMAN, 1971). No entanto, 90% de sobrevivência pode ser obtida utilizando o méto do proposto para plântulas microenxertadas (NAVARRO *et alii*, 1975): As plântulas com aproximadamente 3 cm são removidas dos tubos para potes con tendo um substrato esterilizado formado por areia fina e terra preta (1:1). Os potes são protegidos por um saco plástico transparente para reduzir a perda de umidade e colocados em área sombreada em casa de vegetação. Após uma semana os sacos são abertos e, na segunda semana removidos e as plântu las deixadas a crescer sob condições normais de casa de vegetação.

A perda de plântulas quando da transferência para o solo é atribuída a 2 fatores fundamentais (CAILLOUX, 1984): 1) as plântulas podem perder quantidades excessivas de água porque elas não tem desenvolvidos sis temas apropriados para a incorporação e conservação de água e, 2) raízes formadas em agar não são funcionais quando transplantadas para o solo, ha vendo a necessidade do desenvolvimento de novas raízes.

Plântulas de citros obtidas por cultura de tecidos tendem a ter um crescimento lento e são comparativamente fracas "in vivo" sobre suas próprias raízes, mesmo depois de terem se estabelecido plenamente no solo (NAVARRO e JUAREZ, 1977 a,b). O problema tem sido contornado com o uso de enxertia.

Gemas da porção terminal sem espinhos de plântulas de 'Navelina' e 'Staggs Bonanza' obtidas por cultura de óvulos não fertilizados foram enxertadas sobre citrange 'Troyer' e plântulas de laranja doce, ambos com 4 anos de idade. Dois anos após a enxertia as plantas produziram os primeiros frutos (STARRANTINO e RUSSO, 1983).

Tem sido sugerido (STARRANTINO et alii, 1978) que plântulas com 4-5 folhas, obtidas de pseudobulbilhos oriundos de cultura de tecido nucelar, sejam transferidas para solução de Hoagland, adicionada de GA_3 -10 mg/l, por 2-4 semanas antes de irem para a terra. Chama-se a atenção para o fato de que se as plantas forem deixadas em GA_3 , seus brotos se tornam longos e em forma de fuso e invariavelmente morrerão quando transplantadas para o solo. Após a formação de raízes e iniciado o desenvolvimento de ramos, as plântulas seriam transferidas para outro meio sem GA_3 para evitar o desenvolvimento de plântulas fracas. Concentrações de Fe (quelatos) mais altas que as normais evitam cloroses (BUTTON e BORNMAN, 1971; NAVARRO et alii, 1979).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos junto às Seções de Radiogenética e Bioquímica de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), órgão da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba-SP.

Os frutos e flores das cultivares 'Valência' e 'Pera Bianchi' (*Citrus sinensis* Osb.) utilizados para extração de núcelos e óvulos e frutos de 'Trifoliata' (*Poncirus trifoliata* Raf.) para extração das sementes, foram obtidos junto à Estação Experimental de Limeira, unidade do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), em Cordeirópolis-SP.

O desenvolvimento do presente trabalho se deu concomitantemente à montagem do laboratório de cultura de tecidos da Seção de Radiogenética, exigindo a improvisação de determinados procedimentos, o que pode eventualmente ter interferido em alguns resultados.

3.1. Assepsia

A assepsia dos frutos e flores foi procedida a partir de uma raspagem da superfície externa (para os frutos), foram lavados primeiramente em água corrente, a seguir em solução de água e detergente e, esterilizada

zados com hipoclorito de sódio-2% durante 20 minutos. Posteriormente, em condições assépticas, fizeram-se 3 lavagens com água destilada autoclavada. As gemas axilares utilizadas para a micropropagação foram obtidas de plântulas produzidas "in vitro" e portanto, já estavam assépticas.

3.2. Meio de cultura

O meio de cultura utilizado se constituiu (em mg/l) dos macronutrientes do meio "MS": NH_4NO_3 -1650, KNO_3 -1900, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -440, $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -370, KH_2PO_4 -170, Na_2EDTA -37,3, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -27,8; dos micronutrientes do meio "MS": $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -22,3; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -8,6; H_3BO_3 -6,2; KI -0,83; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -0,25; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -0,025; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -0,025 e foi adicionado de: tiamina HCl -0,2; piridoxina HCl -1,0; ácido nicotínico-1,0; meso inositol-100; EM-500 e sacarose-50.000 - meio básico "MS". Em alguns casos foi usado o meio "MT", que difere do meio básico "MS" apenas nas concentrações de vitaminas (tiamina HCl -10, piridoxina HCl -10 e ácido nicotínico-5 mg/l) e não possui EM. O pH foi ajustado para 5,7, o meio solidificado com bacto agar 8 g/l e autoclavado a 120°C por 20 minutos.

3.3. Condições de crescimento

A maior parte das culturas foi mantida à luz (aproximadamen

te 1500 lux) durante 16 horas diárias e uma temperatura em torno de 27° C. O delineamento experimental utilizado em todos os experimentos foi o inte
ramento casualizado. Para efeitos de análise estatística os dados de con
tagem foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$ e os de percentagem em $\text{arc sen } \sqrt{x + 0,5}$.

3.4. Cultura de núcelos de 'Valência'

3.4.1. Extração do nucelo

Frutos da cultivar 'Valência' com aproximadamente 12 semanas após a polinização foram cortados em condições assépticas, e os óvulos re
movidos foram colocados em placas de Petri esterilizadas. Com auxílio de bisturi e sobestereomicroscópio, através de um corte longitudinal no óvulo, removeram-se os integumentos e, com um corte transversal na região micropi
lar do nucelo, procedeu-se a eliminação do embrião zigótico.

Esporadicamente, por ocasião da inoculação, se observaram al
guns embriões, os quais foram eliminados. Isto mostra que este seria o prazo máximo para extração de núcelos da cultivar 'Valência', posteriormen
te a isso o nucelo já teria diferenciado os embriões.

3.4.2. Diferentes concentrações de auxina/citocinina

Os núcelos foram colocados individualmente em frascos contendo 10 ml do meio básico "MS" adicionado de todas as combinações possíveis de Cin (0,0; 0,25; 0,50; 1,0; 1,5 mg/l) e 2,4-D (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 mg/l). Das 20 repetições, 10 foram expostas à luz e 10 mantidas no escuro. -

A avaliação foi feita quanto ao número de embriões por nucelo, e as percentagens de enraizamento dos embriões e de núcelos que apresentaram calos.

3.4.3. Irradiação de tecido nucelar

Cada núcelo foi inoculado em um tubo de ensaio (10 x 2 cm) contendo 10 ml do meio básico "MS". A irradiação foi feita com raios gama da fonte de ^{60}Co do CENA-USP, nas doses de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 12,0 kR, a uma intensidade de 97 kR/h, em cada um dos seguintes experimentos:

1) Os núcelos juntamente com o meio de cultura foram irradiados em diferentes fases:

- por ocasião da inoculação tratamento A
- uma semana após a inoculação tratamento B
- duas semanas após a inoculação tratamento C
- três semanas após a inoculação tratamento D
- sem irradiação tratamento testemunha

2) Foram efetuados diversos tratamentos por ocasião da inoculação:

- irradiação do meio tratamento E
- irradiação do núcelo tratamento F
- irradiação do meio e do núcelo tratamento G
- sem irradiação tratamento testemunha

Obs.: O tratamento testemunha é o mesmo para os 2 experimentos e o tratamento G do experimento 2 corresponde ao tratamento A do experimento 1.

Usaram-se 20 repetições mantidas à luz e foram efetuadas as seguintes avaliações: número de embriões por nucelo e percentagens de nucelos com calos, de embriões com raiz e de deformações nos cotilédones.

3.5. Cultura de óvulos abortivos de 'Pera'

3.5.1. Diferentes fases de desenvolvimento

Foram utilizadas flores da cultivar 'Pera Bianchi' imediatamente antes da antese e frutos com as seguintes medidas médias (comprimento x espessura em cm): 0,95 x 0,77; 1,25 x 1,02; 1,62 x 1,60; 2,55 x 2,29; 3,38 x 3,02, colhidos numa mesma época. O meio de cultura foi o "MS" e usaram-se 10 repetições à luz e 10 no escuro.

O experimento foi avaliado pelo número de embriões por óvulo e pela percentagem de óvulos com calos.

3.5.2. Diferentes meios de cultura

Foram utilizados frutos da cultivar 'Pera Bianchi' com aproximadamente 3 cm de diâmetro. Os óvulos foram inoculados em meio "MS" adicionado de um dos seguintes tratamentos (em mg/l): a) AA-40; b) EM-500; c) EL-500; d) AC-10%; e) CH-400; f) AD-40; g) AD-40 + EM-500; h) AD-40 + NAA-0,25 + ACi-2,0; i) AD-40 + Cin-0,25; j) Cin-0,5 + 2,4-D-2,0. As 10 repetições foram mantidas à luz.

Avaliou-se o número de embriões por óvulo e a percentagem de embriões com plântulas e calos.

3.6. Cultura de calos de 'Valência'

Calos friáveis formados em sua maioria por corpúsculos globulares (pseudobulbilhos) obtidos a partir de nucelos inoculados em meio irradiado principalmente com 12 kR, foram subcultivados periodicamente (a intervalos de aproximadamente 6 semanas), no mesmo meio básico "MS" e mantidos à luz.

3.6.1. Desenvolvimento de pseudobulbilhos

Foram testados os seguintes componentes adicionados ao meio "MS" (em mg/l): a) meio "MS"-testemunha; b) EM-2500; c) EM-2500 + ADS-30; d) EM-2500 + BAP-20; e) ADS-40; f) GA_3 -1; g) GA_3 -1 + ADS-30; h) GA_3 -10 + ADS-60; i) GA_3 -10; j) Cin-0,1 + IAA-1; k) Cin-1 + IAA-0,1; l) AC-10%; m) CH-400 + EL-500. Em cada frasco contendo 20 ml do meio colocaram-se 20 pseudobulbilhos e foram usadas 10 repetições mantidas à luz.

Após 50 dias da inoculação, o experimento foi avaliado quanto ao número de embriões e proembriões diferenciados, e percentagem de culturas apresentando crescimento de calos.

3.6.2. Irradiação de calos globulares (pseudobulbilhos)

Calos friáveis com corpúsculos globulares (pseudobulbilhos) obtidos de cultura de nucelos e óvulos foram submetidos à irradiação nas doses de 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 e 33 kR a uma intensidade de 97 kR/h. Como avaliação, foi contado o número de embriões diferenciados por cultura e registrada a percentagem de embriões anormais.

3.7. Individualização de embriões

3.7.1. Processo seguido para todos os experimentos

Após aproximadamente 9 semanas da inoculação de núcelos e 12 da inoculação de óvulos, os embriões atingindo um tamanho de 4-12 mm eram individualizados em tubos de ensaio (20 x 2 cm) contendo 15 ml do meio básico "MS".

3.7.2. Enraizamento de embriões de 'Valência'

Embriões oriundos diretamente de núcelos foram colocados individualmente em tubos contendo o meio "MS" adicionado de (em mg/l): NAA -0,1 ou 1,0; IAA-1,0; GA₃-1,0 ou IBA-1,0.

Embriões pequenos (menores que 3 mm), médios (3-6 mm) e grandes (maiores que 6 mm) oriundos de calos nucelares foram inoculados em meio "MS" adicionado de (em mg/l): NAA-0,1; 1,0 ou 5,0; IAA-1,0; IBA-1,0 ; GA₃-1,0 ou 5,0; ADS-27,0 ou GA₃-1,0 + ADS-27,0.

Em ambos os casos foram usadas 10 repetições cada uma constituída de 5 embriões. A avaliação foi feita através da percentagem de enraizamento em relação aos tubos remanescentes (eliminados os que apresentavam contaminação).

3.8. Propagação clonal de 'Valência' e 'Trifoliata'

3.8.1. Multiplicação de gemas axilares

Gemas axilares da cultivar 'Valência' foram excisadas de

plantas obtidas "in vitro" por cultura de nucelos e, do porta-enxerto 'Trifoliata' obtidas de "seedlings" cujas sementes foram colocadas para germinar em condições assépticas. Para a obtenção destes "seedlings" foram removidos os integumentos das sementes, a seguir esterilizadas em hipoclorito de sódio 1% e incubadas em meio líquido constituído pelos macro e micro nutrientes do meio "MS".

Cada tubo (10 x 2 cm), contendo 10 ml do meio, foi inoculado com uma gema acompanhada de um pequeno segmento do caule (aproximadamente 0,5 cm).

Utilizou-se o meio básico "MS" adicionado de todas as combinações possíveis de NAA e BAP nas concentrações de 0,0; 0,1; 1,0; 5,0 e 10,0 mg/l para 'Trifoliata', e 0,0; 0,2; 2,0 e 5,0 mg/l para 'Valência'. Foram usadas 10 repetições para 'Trifoliata' e 11 para 'Valência', cada uma constituída de 4 tubos de ensaio.

A avaliação, estabelecendo-se o número médio de brotos com mais de 1 cm por tubo remanescente, foi realizada após 2 meses de inoculação, quando os brotos formados foram excisados e transferidos para meio de enraizamento. Nesta mesma ocasião, registrou-se a presença de raízes e calos e estabeleceu-se uma percentagem de frascos que deram alguma resposta, computando-se para tal fim tanto a multiplicação de gemas, como formação de raízes e calos.

3.8.2. Enraizamento de brotos

Segmentos do caule com aproximadamente 1 cm de comprimento,

apresentando duas gemas em média, obtidos dos experimentos de multiplicação com 'Valência' e 'Trifoliata' foram inoculados em tubos de ensaio (20 x 2 cm) contendo 15 ml do meio "MS", adicionado de um dos seguintes reguladores de crescimento (em mg/l): NAA-0,1; 0,5; 1,0 ou 5,0; IBA-1,0; 2,0; 5,0 ou 10,0; NAA-0,1 + IBA-2,0; NAA-1,0 + IBA-2,0 ou 5,0; NAA-5,0 + IBA-2,0; NAA-5,0 + BAP-0,1 ou GA₃-5,0. Foram feitas 10 repetições, cada uma constituída de 5 tubos.

Os dados foram tomados em percentagem de enraizamento com relação aos tubos remanescentes por ocasião da remoção das plantas para o solo.

3.9. Cultura de segmentos do fruto de 'Pera'

Frutos da cultivar 'Pera Bianchi' com aproximadamente 3 cm de diâmetro foram, após a esterilização, excisados em condições assépticas. Segmentos de albedo com aproximadamente 0,5 x 0,5 x 0,2 cm, de flavedo com 0,5 x 0,5 cm e porções com 5-6 vesículas, foram inoculados em meio "MT" com todas as combinações possíveis de cinetina (0,0; 0,25; 0,50; 1,0 mg/l) e 2,4-D (0,0; 5,0; 1,0 e 2,0 mg/l) em um experimento, bem como cinetina (0,0; 0,215 e 2,15 mg/l) e IAA (0,0; 0,175; 1,75 e 17,5 mg/l) em outro. Usaram-se 10 repetições por tecido em cada experimento, cada uma constituída de um frasco com 10 ml do meio, sendo mantidas 5 no escuro e 5 na luz.

A avaliação foi feita 60 dias após a inoculação. As culturas foram agrupadas de acordo com o crescimento apresentado e estabelecidas as seguintes classes:

Exp. 1 - Concentrações de Cin e 2,4-D

	<u>albedo</u>	<u>vesículas</u>
Grau 0 = sem crescimento		
Grau 1 = calos com:	inferior a 0,2 g	inferior a 0,5 g
Grau 2 = calos com:	0,2 a 0,4 g	0,5 a 1,0 g
Grau 3 = calos com:	0,4 a 0,6 g	1,0 a 1,5 g
Grau 4 = calos com:	superior a 0,6 g	superior a 1,5 g

Exp. 2 - Concentrações de Cin e IAA

	<u>albedo</u>	<u>vesículas</u>
Grau 0 = sem crescimento		
Grau 1 = calos com:	inferior a 0,1 g	inferior a 0,1 g
Grau 2 = calos com:	0,1 a 0,3 g	0,1 a 0,5 g
Grau 3 = calos com:	0,3 a 0,6 g	0,5 a 1,0 g
Grau 4 = calos com:	superior a 0,6 g	superior a 1,0 g

Foram pesados alguns calos para que as classes pudessem ser estabelecidas e os demais foram classificados por comparação e determinada uma percentagem de calos para cada classe.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Cultura de nucelos de 'Valência' em diferentes níveis de auxina e citocinina

A adição de auxina e citocinina promoveu, de modo geral, uma redução no processo de embriogênese dos nucelos de 'Valência' cultivados "in vitro".

Observe-se na Tabela 1 e Figura 1 que, com as culturas expostas à luz, na ausência de 2,4-D, não houve diferença significativa para número de embriões por nucelo entre as doses 0,0; 0,25 e 0,5 mg/l de Cin, pelo teste Tukey-5%. A adição de 0,5 mg/l de 2,4-D, na ausência de Cin, reduziu significativamente o número de embriões e, esta redução foi mais acentuada em presença de Cin. Percebe-se ainda nos valores estabelecidos para média na Tabela 1, que os efeitos prejudiciais da adição de doses baixas de Cin não são significativos, o contrário do que se verifica com o 2,4-D.

Quando os nucelos foram mantidos no escuro (Tabela 2), o número de embriões na ausência de Cin e 2,4-D foi estatisticamente superior aos demais tratamentos. A redução foi drástica já com a adição de Cin-0,25

TABELA 1. Número médio de embriões obtidos em cultura de nucelos de 'Valência' em diferentes combinações de Cin e 2,4-D expostos à luz.

Cin	2,4-D	2,4-D (mg/l)				
		0,0	0,5	1,0	2,0	Média
Cin (mg/l)	0,0	4,6 ab A	1,8 a B	0,4 B	0,4 B	1,80 a
	0,25	4,1 ab A	0,5 b B	0,3 B	0,0 B	1,22 bc
	0,50	5,6 a A	0,4 b B	0,2 B	0,0 B	1,55 ab
	1,0	2,5 bc A	0,0 b B	0,0 B	0,0 B	0,62 cd
	1,5	2,2 c A	0,0 b B	0,0 B	0,0 B	0,55 d
	Média	3,80 A	0,54 B	0,18 B	0,08 B	

As médias seguidas da mesma letra (minúscula para níveis de Cin e maiúscula para níveis de 2,4-D) não diferem entre si pelo teste Tukey-5%.

FIGURA 1. Número médio de embriões por nucelo nos diferentes níveis de Cin e 2,4-D.

TABELA 2. Número médio de embriões obtidos em cultura de nucelos de 'Valência' em diferentes combinações de Cin e 2,4-D mantidos no escuro.

2,4-D		2,4-D (mg/l)				
Cin		0,0	0,5	1,0	2,0	Média
Cin (mg/l)	0,0	6,6 a A	0,0 B	0,0 B	0,0 B	1,65 a
	0,25	2,3 b A	0,0 B	0,0 B	0,0 B	0,57 ab
	0,5	2,5 bc A	0,0 B	0,0 B	0,0 B	0,62 ab
	1,0	1,5 cd A	0,0 B	0,0 B	0,0 B	0,37 b
	1,5	1,0 d A	0,0 B	0,0 B	0,0 B	0,25 b
	Média	2,8 A	0,0 B	0,0 B	0,0 B	

As médias seguidas da mesma letra (minúscula para níveis de Cin e maiúscula para níveis de 2,4-D) não diferem entre si pelo teste Tukey-5%.

FIGURA 2. Diferenciação de embriões a partir de nucelos de 'Valência' após 9 semanas de cultivo em diferentes níveis de cinetina.

mg/l e observou-se uma tendência, inclusive com diferenças significativas, de ampliar a redução nas doses mais elevadas (Figura 2). A adição de qualquer concentração de 2,4-D a nucelos mantidos no escuro inibiu totalmente a embriogênese, independentemente da presença de Cin.

Um efeito negativo mais acentuado de Cin e 2,4-D sobre nucelos mantidos no escuro, talvez esteja relacionado ao fato de que os hormônios em meio de cultura exposto à luz se degradam mais facilmente, anulando seu efeito inibidor sobre a embriogênese.

Os dois reguladores de crescimento se mostraram detrimentais também ao crescimento dos embriôides formados, uma vez que houve tendência de concentração dos embriôides nas classes médio e pequeno com o aumento de seus níveis (Tabela 3).

Estes resultados estão de acordo com afirmações feitas por *ESAN (1973)*, de que a adição de auxinas e citocininas suprime a embriogênese em tecido nucelar de citros. Isto leva a crer que estes tecidos possuem um nível endógeno destas substâncias e que um incremento neste nível o tornaria além dos limites ótimos necessários para que ocorra embriogênese. Prova disso é que a adição de inibidores da síntese de auxinas e citocininas estimula fortemente este processo (*KOCHBA e SPIEGEL-ROY, 1977*).

Os primeiros sinais mostrando diferenciação dos nucelos foram observados duas semanas após a inoculação, através de um tecido de coloração verde que foi gradualmente aumentando de volume e, no final da quarta semana, os embriôides já eram distinguíveis. Após nove semanas de cultura, podia-se notar uma massa de embriôides que ocupava praticamente toda a su

TABELA 3. Observações realizadas em núcelos de 'Valência' cultivados em diferentes combinações de Cin e 2,4-D.

TRATAMENTOS mg/l	LUZ						ESCURO					
	EMBRIOÍDES (%)			ENRAIZA MENTO (%)	FRASCOS COM CALOS (%)	EMBRIOÍDES (%)			ENRAIZA MENTO (%)	FRASCOS COM CALOS (%)		
	G	M	P			G	M	P				
Cin 2,4-D												
0,0 + 0,0	51	19	30	70,3	10	74	21	5	66,7	10		
0,0 + 0,5	0	0	100	40,0	40	-	-	-	-	20		
0,0 + 1,0	0	100	0	50,0	60	-	-	-	-	20		
0,0 + 2,0	0	0	100	33,5	40	-	-	-	-	50		
0,25 + 0,0	17	20	63	43,9	20	52	48	0	61,9	20		
0,25 + 0,5	0	0	100	40,0	10	-	-	-	-	80		
0,25 + 1,0	0	0	100	67,0	30	-	-	-	-	10		
0,25 + 2,0	-	-	-	-	40	-	-	-	-	30		
0,5 + 0,0	18	36	46	42,8	0	10	20	70	55,0	30		
0,5 + 0,5	0	0	100	33,5	50	-	-	-	-	30		
0,5 + 1,0	0	0	100	0,0	50	-	-	-	-	40		
0,5 + 2,0	-	-	-	-	20	-	-	-	-	20		
1,0 + 0,0	0	13	87	52,2	40	0	0	100	42,9	20		
1,0 + 0,5	-	-	-	-	20	-	-	-	-	40		
1,0 + 1,0	-	-	-	-	10	-	-	-	-	0		
1,0 + 2,0	-	-	-	-	50	-	-	-	-	30		
1,5 + 0,0	25	25	50	45,0	50	50	0	50	75,0	10		
1,5 + 0,5	-	-	-	-	70	-	-	-	-	70		
1,5 + 1,0	-	-	-	-	50	-	-	-	-	10		
1,5 + 2,0	-	-	-	-	30	-	-	-	-	40		

G = Grande (> 6 mm); M = medio (3-6 mm); P = pequeno (< 3 mm)

G = Grande (> 6 mm); M = medio (3-6 mm); P = pequeno (< 3 mm)

perfície do frasco (Figura 3), ocasião em que foram individualizados para que tivesse continuidade o processo de desenvolvimento. Chegou-se a observar 12 embriões oriundos de um único nucelo.

O enraizamento dos embriões não parece ter sofrido a influência da Cin e 2,4-D (Tabela 3), mesmo porque eles foram transferidos para meio sem estes hormônios, onde se daria a diferenciação de raízes.

FIGURA 3. Embriões de 'Valência' diferenciados a partir de núclos cultivados "in vitro" na ausência de Cin e 2,4-D.

A presença de calos originários de núclos ou mesmo de embriões foi evidenciada em praticamente todos os tratamentos, com ou sem a presença de auxina e citocinina, tanto à luz como no escuro (Tabela 3, Figura 4).

Um efeito diferencial também para a produção de calos foi observado de acordo com as condições às quais as culturas foram expostas.

Em meio desprovido de 2,4-D (Figura 4A), a máxima percentagem de núcelos com calos foi observada com 0,5 mg/l de Cin quando mantidos no escuro, ao passo que os índices maiores para culturas expostas à luz foram observados com concentrações mais elevadas de Cin, uma vez que estes dois reguladores de crescimento induzem a formação de calos, em razão inversa a diferenciação de embriões.

Este mesmo tipo de comportamento é visto na presença de 0,5 mg/l de 2,4-D e 0,25 mg/l de Cin (Figura 4B), onde a presença de calos foi mais evidente no escuro do que na luz, confirmando justificativa dada para embriogênese em núcelos, de que a exposição do meio à luz causa uma degradação destes hormônios.

Um exame mais detalhado de alguns calos fez verificar a presença de pseudobulbilhos, alguns dos quais posteriormente se transformaram em embriões.

Como os embriões formados tem origem unicelular, estes calos globulares se constituem num excelente material para estudos de indução de mutações, através dos quais se pode contornar o problema do quimerismo, normalmente verificado no tratamento de órgãos multicelulares com agentes mutagênicos.

Esta mesma constatação havia sido feita por RANGASWAMY (1961), DEIDDA (1973), KOCHBA *et alii* (1972), NAVARRO *et alii* (1979), percebendo a presença esporádica de calos globulares independentemente da inclusão de auxinas e citocininas.

FIGURA 4. Produção de calos (%) a partir de nucelos de 'Valência' cultivados em diferentes níveis de Cin e 2,4-D (A-0,0; B-0,5; C-1,0 e D-2,0 mg/l).

4.2. Irradiação do tecido nucelar de 'Valência'

Quando os nucelos juntamente com o meio de cultura foram tratados com raios-gama, em todas as fases houve um decréscimo no número de embriões por nucelo à medida que se elevaram as doses de radiação. Em termos médios as doses 0,5 e 1,0 kR foram estatisticamente iguais, diferindo de todas as demais pelo teste Tukey a 5% (Tabela 4, Figura 5).

Esta redução no número de embriões em nucelos tratados por ocasião da inoculação (Tratamento A) e uma semana depois (Tratamento B) foi mais nítida em doses superiores a 2,0 kR. O teste Tukey a 5% não mostrou diferença significativa entre o tratamento 0,5 kR por ocasião da inoculação (Tratamento A), 0,5; 1,0 e 2,0 kR uma semana após a inoculação (Tratamento B) e a testemunha (Tabela 5). O estímulo à diferenciação dos embriões resultantes de nucelos da cv. 'Shamouti' tratada com 0,5 e 1,0 kR, verificado por *SPIEGEL-ROY e KOCHBA (1973)*, não foi evidenciado no presente trabalho.

Os efeitos detrimenais dos tratamentos com raios-gama foram mais evidentes a medida que a irradiação se procedeu em data mais distante da inoculação, chegando-se ao extremo de uma dose relativamente baixa como 2,0 kR ser letal, se aplicada três semanas após a inoculação (Figura 5 - Trat. D).

De modo geral a irradiação uma semana após a inoculação, independentemente de dose, foi a que forneceu o maior número de embriões, diferindo estatisticamente das demais fases pelo teste de Tukey a 5% (Tabela 4).

TABELA 4. Número de embriões obtidos em cultura de nucelos de 'Valência' submetidos a diferentes doses de radiação gama na inoculação (A), uma (B), duas (C) e três semanas depois (D).

FASE DOSE(kR)	A	B	C	D	MÉDIA
0,5	3,6 a A	4,7 ab A	1,8 a B	1,3 a B	2,8 a
1,0	2,8 ab B	5,2 a A	1,5 a B	0,5 ab C	2,5 a
2,0	3,3 ab A	3,4 bc A	0,7 ab B	0,0 b B	1,8 b
4,0	1,7 bc A	1,9 cd A	0,3 b B	0,0 b B	1,0 c
8,0	1,0 cd A	1,2 de A	0,1 b BC	0,0 b C	0,6 cd
12,0	0,0 d	0,4 e	0,0 b	0,0 b	0,1 d
Média	2,1 B	2,8 A	0,7 C	0,3 D	

As médias seguidas da mesma letra (minúscula para doses e maiúscula para fases) não diferem entre si pelo teste Tukey-5%.

FIGURA 5. Número de embriões obtidos em cultura de nucelos submetidos a diferentes doses de radiação gama e em diferentes fases.

TABELA 5. Observações realizadas em cultura de núcleos de 'Valência' submetidos a diferentes doses de radiação gama na inoculação (A), uma (B), duas (C) e três (D) semanas depois.

TRATAMENTO KR	EMBRIÓIDES / FRASCO (Nº)	% DE EMBRIÓIDES				COM RAIZ	EMBRIÓIDES ANORMAIS (%)	FRASCOS COM CALOS GLOBULARES (%)
		G	M	P				
A								
(Testemunha)	4,9 ab	57,0	15,1	11,4	16,5		10,6	18,7
0,5	3,6 abcd	25,9	37,0	20,4	15,9		21,0	33,3
1,0	2,8 cdefg	48,0	41,7	0,0	10,3		23,8	17,6
2,0	3,3 bcdef	36,7	41,6	15,0	6,7		68,7	27,7
4,0	1,7 efghi	0,0	51,8	25,9	22,3		66,6	6,2
8,0	1,0 ghijk	52,9	23,6	0,0	23,5		66,6	0,0
12,0	0,0 k							0,0
B								
0,5	4,7 abc	10,7	28,0	28,0	33,3		0,0	31,2
1,0	5,2 a	40,4	9,6	29,8	20,2		34,6	55,5
2,0	3,4 abcde	7,8	13,7	68,6	9,9		0,0	60,0
4,0	1,9 defgh	62,5	25,0	12,5	0,0		75,0	0,0
8,0	1,2 fghij	45,4	36,3	18,3	0,0		81,8	5,5
12,0	0,4 hijk	16,6	33,4	50,0	0,0		62,0	14,3
C								
0,5	1,8 defgh	48,4	32,2	19,4	0,0		42,8	5,9
1,0	1,5 efghi	0,0	0,0	100,0	0,0		0,0	0,0
2,0	0,7 hijk	0,0	100,0	0,0	0,0		0,0	0,0
4,0	0,3 ijk	0,0	0,0	100,0	0,0		0,0	0,0
8,0	0,1 jk	0,0	50,0	50,0	0,0		0,0	0,0
12,0	0,0 k	-	-	-	-		-	-
D								
0,5	1,3 fghij	70,6	11,8	17,6	0,0		73,6	0,0
1,0	0,5 hijk	11,1	33,3	0,0	55,6		33,3	0,0
2,0	0,0 k	-	-	-	-		-	-
4,0	0,0 k	-	-	-	-		-	-
8,0	0,0 k	-	-	-	-		-	-
12,0	0,0 k	-	-	-	-		-	-

G, M, P = embrioides grandes (> 6mm), médios (3-6 mm) e pequenos (< 3mm).

39

G, M, P = embriões grandes (> 6mm), médios (3-6 mm) e pequenos (< 3mm).

O número de embriões obtidos foi baixo, caracterizando o nucelo como um tecido cujas células são extremamente sensíveis à radiação. Apesar disto e da disponibilidade de núclos ter uma limitação sazonal, além da dificuldade da sua extração, a aplicação de tratamentos mutagênicos a estes tecidos nucelares se constitui numa alternativa de melhoramento genético, considerando a origem unicelular dos embriões, evidenciada em estudos de microscopia eletrônica levados a efeito por *BUTTON et alii* (1974).

Observe-se na Tabela 6 e Figura 6 que a irradiação apenas dos núclos (Trat. F) mostrou um efeito similar àquele fornecido pela irradiação do nucelo e do meio por ocasião da inoculação (Trat. G). Por outro lado observou-se que com a irradiação apenas do meio de cultura (Trat. E) houve um decréscimo no número de embriões diferenciados nas doses mais baixas, o qual foi gradualmente se elevando, atingindo valor superior à testemunha na dose de 12,0 kR, embora não diferindo significativamente das doses 8,0 e 4,0 kR.

Sob o ponto de vista estatístico os tratamentos do meio nas doses de 4,0; 8,0 e 12,0 kR, do nucelo com 1,0 kR, do nucelo e do meio com 0,5 e 2,0 kR não diferiram da testemunha pelo teste Tukey a 5% (Tabela 7).

Este estímulo à embriogênese fornecido pela irradiação do meio de cultura tem sido atribuído a uma redução dos níveis de auxina (*CHOU REY et alii*, 1973) ou de outras substâncias inibidoras do processo embriogênico. Auxinas e citocininas inibem a embriogênese de núclos e calos nucelares, porém irradiação do meio de cultura adicionado de Cin-0,1 mg/l e IAA-0,1 mg/l (*SPIEGEL-ROY e KOCHBA*, 1980) estimulou notavelmente a diferen

TABELA 6. Número de embriões obtidos em cultura de nucelos de 'Valência' após irradiação (em diferentes doses) do meio (E), do nucelo (F) ou do meio e do nucelo (G).

MAT. DOSE (kR)	E	F	G	MÉDIA
0,5	2,1 b	2,8 a	3,6 a	2,8 a
1,0	3,1 b	3,3 a	2,8 a	3,1 a
2,0	2,7 b	3,0 a	3,3 a	3,0 a
4,0	3,7 ab A	1,8 a B	1,7 ab B	2,4 ab
8,0	3,9 ab A	1,9 a B	1,0 b B	2,3 ab
12,0	5,9 a A	0,3 b B	0,0 b B	2,2 b
Média	3,6 A	2,2 B	2,1 B	

As médias seguidas da mesma letra (minúscula dose e maiúscula para material tratado) não diferem entre si pelo teste Tukey-5%.

FIGURA 6. Número de embriões obtidos de nucelos após irradiação (em diferentes fases) do meio (E), do nucelo (F) ou do nucelo e do meio (G).

TABELA 7. Observações realizadas em cultura de núcelos de 'Valência' após irradiação (em diferentes doses) do meio (E), do núcelo (F) ou do meio e do núcelo (G).

TRATAMENTO kr	EMBRIÓIDES / FRASCO (Nº)	% DE EMBRIÓIDES				COM RAIZ	EMBRIÓIDES ANORMAIS (%)	FRASCOS COM CALOS GLOBULARES (%)
		G	M	P	PRO			
E								
(Testemunha)	4,9 ab	57,0	15,1	11,4	-	16,5	10,6	18,7
0,5	2,1 bcd	18,7	12,5	12,5	31,5	24,8	9,4	60,0
1,0	3,1 bcd	30,3	16,0	19,6	10,7	23,4	28,5	22,2
2,0	2,7 bcd	22,7	11,4	15,9	6,8	43,2	27,2	12,5
4,0	3,7 abc	11,8	8,5	20,3	27,1	32,3	10,2	43,7
8,0	3,9 abc	21,0	24,2	16,1	22,6	16,1	14,5	56,2
12,0	5,9 a	16,7	18,0	18,0	37,3	10,0	21,7	85,8
F								
0,5	2,8 bcd	44,4	11,2	15,5	4,5	24,4	8,9	6,3
1,0	3,3 abc	40,8	6,1	18,4	10,2	24,5	36,7	13,3
2,0	3,0 bcd	14,3	26,2	14,3	35,7	9,5	30,9	50,0
4,0	1,8 cde	30,8	15,4	11,5	34,6	7,7	53,8	60,0
8,0	1,9 cde	50,0	18,7	25,0	0,0	6,3	71,8	5,8
12,0	0,3 e	40,0	20,0	40,0	0,0	0,0	80,0	6,7
G								
0,5	3,6 abc	25,9	37,0	20,4	0,0	15,9	21,0	33,3
1,0	2,8 bcd	48,0	41,7	0,0	0,0	10,3	23,8	17,6
2,0	3,3 abcd	36,7	41,6	15,0	0,0	6,7	68,7	27,7
4,0	1,7 cde	0,0	51,8	25,9	0,0	22,3	66,6	6,2
8,0	1,0 de	52,9	23,6	0,0	0,0	23,5	66,6	0,0
12,0	0,0 e	-	-	-	-	-	-	0,0

G = grande (> 6 mm), M = médio (3-6 mm), P = pequenos (< 3 mm), PRO = proembriões.

ciação de embriões. Provavelmente alguma substância componente do meio estaria comprometendo a embriogênese e, com a irradiação, estas substâncias seriam reduzidas a um nível mais próximo do ótimo para diferenciação de embriões.

O incremento na formação de calos constituídos por corpúsculos globulares em meio tratado com altas doses de radiação, como pode ser visto na Tabela 6 e Figura 7, fornece outra explicação para o aumento do número de embriões neste mesmo meio. Estes calos são altamente embriogênicos (Figura 8) e poderiam ter sido os responsáveis pelo número adicional de embriões diferenciados. A irradiação apenas do nucelo (Tabela 7, Trat. F) com doses de 2,0 e 4,0 kR estimulou fortemente a formação deste tipo de calo (Figura 7). Nos demais tratamentos, a presença destes calos não foi tão significativa, a não ser nas doses de 1,0 e 2,0 kR, aplicadas ao nucelo uma semana após a inoculação (Tabela 5 - Trat. B), onde também foi evidenciado o número máximo de embriões por nucelo.

Tanto os núclos como os calos nucelares se constituem, juntamente com protoplastos, suspensão celular e micrôsporos, em materiais extremamente úteis no melhoramento por indução de mutações, utilizando as técnicas de cultura de tecidos e células. Isto significaria também uma pré-seleção em uma escala sem precedente, e uma apreciável contribuição à variabilidade genética.

O desenvolvimento e aperfeiçoamento dos métodos pode, de fato, dirigir uma maior parte dos esforços com melhoramento, no futuro, em direção à mutagênese.

FIGURA 7. Núcelos que produziram calos (%) após irradiação (em diferentes doses) do meio (E), do núcelo (F) ou do meio e do núcelo (G).

Observou-se um elevado índice de anormalidade nos embriões oriundos de núcelos irradiados (Tabelas 5 e 7), principalmente com doses mais elevadas. Embriões fasciados, com muitos cotilédones unidos entre si e embriões com cotilédones de tamanho diferente foram as principais de formações encontradas. Anomalias similares tem sido reportadas por vários autores (DEIDDA, 1973; JUAREZ *et alii*, 1976; STARRANTINO *et alii*, 1978), porém, em menor extensão, mesmo sem o uso de agentes mutagênicos.

Plantas obtidas por cultura de núcelos, de modo geral, apresentaram-se normais sob o ponto de vista morfológico. Apenas eventuais bifurcações do caule ou ligeiras modificações na forma da folha foram eviden

FIGURA 8. Calos globulares obtidos de nucelos de 'Valência' cultivados em meio irradiado, mostrando elevado potencial embriogênico.

ciadas. Fato semelhante foi observado por NAVARRO *et alii* (1979), onde plantas oriundas de embriões anormais apresentaram-se sem qualquer alteração externa. Por outro lado, JUAREZ *et alii* (1976) e STARRANTINO *et alii* (1978) relataram a presença de caracteres anormais em 20% das plantas nucleares, principalmente aqueles relacionados com pecíolos e forma de folha.

Esta aparente normalidade de plantas deve estar relacionada ao fato de que a grande maioria dos embriões deformados não tem condições de regenerar uma planta completa. Sendo assim, plântulas seriam originárias quase exclusivamente de embriões normais, o que reduz em muito o número delas (Tabelas 8 e 9) e, pode levar à falsa impressão de que embriões deformados originam plantas normais. Isto pode ser confirmado observando-se que, em muitos tratamentos com radiação, os embriões obtidos

TABELA 8. Desenvolvimento de embriões (%) individualizados oriundos de núcelos submetidos a diferentes doses de radiação na inoculação (A), uma (B), duas (C) ou três (D) semanas depois.

TRATAMENTO		DIFERENCIAÇÃO DE (%)			
kR	RAIZ	PARTE AÉREA	PLÂNTULA	EMBRIÕES	PROEMBRIÕES
Testemunha	16,0	11,4	63,0	8,0	12,0
<u>A</u>					
0,5	55,2	17,2	10,3	0,0	6,9
1,0	15,8	26,3	21,0	21,0	10,0
2,0	6,7	30,0	30,0	6,7	0,0
4,0	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0
8,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12,0	—	—	—	—	—
<u>B</u>					
0,5	10,5	10,5	42,0	5,3	15,8
1,0	5,7	40,0	34,0	2,8	0,0
2,0	0,0	50,0	16,7	0,0	8,3
4,0	6,2	18,7	43,7	0,0	0,0
8,0	10,0	10,0	50,0	0,0	0,0
12,0	0,0	0,0	33,3	0,0	0,0
<u>C</u>					
0,5	0,0	33,3	16,7	0,0	0,0
1,0	0,0	0,0	20,0	20,0	80,0
2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
8,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<u>D</u>					
0,5	10,5	31,6	18,6	15,8	0,0
1,0	0,0	66,7	0,0	0,0	0,0
2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
8,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

TABELA 9. Desenvolvimento de embriões individualizados obtidos de nuclelos após irradiação (em diferentes doses) do meio (E), do nuclelo (F) ou do nucelo e do meio (G).

TRATAMENTO		DIFERENCIAÇÃO DE (%)			
kr	RAIZ	PARTE AÉREA	PLANTULA	EMBRIÕES	PROEMBRIÕES
Testemunha	16,0	11,4	63,0	8,0	12,0
<u>E</u>					
0,5	14,3	28,6	14,3	7,2	28,5
1,0	8,1	13,5	37,8	5,4	8,1
2,0	4,5	9,1	45,4	18,2	18,2
4,0	37,5	0,0	8,3	0,0	25,0
8,0	5,3	0,0	44,5	15,8	5,3
12,0	14,7	2,9	44,1	55,9	14,7
<u>F</u>					
0,5	21,4	7,1	14,3	0,0	0,0
1,0	6,3	6,2	53,1	28,1	12,5
2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4,0	44,4	0,0	44,4	0,0	33,3
8,0	19,6	5,4	34,0	0,0	14,3
12,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<u>G</u>					
0,5	55,2	17,2	10,3	0,0	6,9
1,0	15,8	26,3	21,0	21,0	10,5
2,0	6,7	30,0	30,0	6,7	0,0
4,0	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0
8,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12,0					

quando individualizados, apresentam um índice de formação apenas de raiz ou de parte aérea muito superior à testemunha (Tabelas 8 e 9).

Ainda nas Tabelas 8 e 9 pode-se perceber que os embriões podem originar novos embriões e proembriões, se constituindo também em uma possibilidade de multiplicação de embriões, desde que lhe sejam fornecidas condições adequadas. Observações similares tem sido feitas por *ESAN (1973)* caracterizando esta proliferação como um processo de gemação.

4.3. Cultura de óvulos abortivos da cv. 'Pera' em diferentes fases

Como se observa na Tabela 10, o número de embriões obtidos com a cultivar 'Pera' em cultura de óvulos abortivos, é bem inferior àquele observado em cultura de nucelos de 'Valência' nos mesmos meio e estágio de desenvolvimento. No estágio E_6 da cv. 'Pera' que corresponde à idade aproximada de 12 semanas, fase normalmente utilizada para extração de nucelos de 'Valência' obteve-se um número médio de 1,0 embrião por óvulo, quando com a cv. 'Valência' foram obtidos até 6,6 embriões por nucelo. Outra observação é que com a cv. 'Pera' nenhum óvulo diferenciou embriões quando mantido no escuro, e sim, apenas calos em até 100% dos explantes, contrariando observações feitas com 'Valência' onde o número de embriões foi maior no escuro do que à luz.

Estes resultados mostram a exigência diferencial com relação às condições de cultura para as diferentes cultivares, corroborando citações de outros autores (*BITTERS et alii, 1970; KOCHBA et alii, 1972; NAVARRO et alii, 1979*), que identificaram variações significativas na percentagem de sucesso entre cultivares.

TABELA 10. Embriões (Nº) e calos (%) obtidos a partir de cultura de ôvulos abortivos de 'Pera' em diferentes fases de desenvolvimento.

TRATAMENTO	Nº MÉDIO DE EMBRIÕES POR FRASCO		% DE FRASCOS COM CALOS	
	LUZ	ESCURO	LUZ	ESCURO
E ₁ - Botão floral	0,0	0,0	0,0	0
E ₂ - Frutos com 0,95 x 0,77 cm	0,4	0,0	0,0	30
E ₃ - Frutos com 1,25 x 1,02 cm	0,7	0,0	0,0	60
E ₄ - Frutos com 1,62 x 1,60 cm	1,0	0,0	0,0	100
E ₅ - Frutos com 2,55 x 2,29 cm	1,8	0,0	0,0	80
E ₆ - Frutos com 3,38 x 3,02 cm	1,0	0,0	0,0	80

Os calos obtidos eram duros (não friáveis), coloração amarelo creme e mostravam crescimento apenas no sentido lateral. Foram observados, esporadicamente, calos altamente embriogênicos (Figura 9).

FIGURA 9. Calos de 'Pera' oriundos de ôvulos abortivos evidenciando a presença de pro-embriões.

A presença de embriões só foi verificada com aproximadamente 7 semanas de cultura, estando de acordo com observações anteriores (NAVARRO *et alii*, 1979) de que óvulos em cultura demoram mais para mostrar diferenciação (até 15 semanas sem nenhum sinal) do que nucelos. O meio para este experimento só foi inoculado 1 mês após sua preparação. Isto evidencia a presença de um determinado balanço de substâncias como exemplo auxinas e citocininas no meio, que estaria inibindo os processos de embriogênese e formação de calos. Com o envelhecimento do meio, talvez os níveis destas substâncias se aproximassem mais do ótimo, tendo sido degradadas principalmente pela luz.

Melhores resultados foram obtidos a partir de um determinado desenvolvimento do fruto (1,62 x 1,60 cm) correspondendo a aproximadamente 6 semanas após a polinização (Tabela 10). Sucesso na cultura de óvulos abortivos tem sido verificado desde a época da polinização até 5 meses depois, porém, com índices ótimos em torno de 6-8 semanas para 'Robertson', 'Valência' e 'Marsh', e até 10-12 semanas para 'Temple' (BITTERS *et alii*, 1970; KOCHBA *et alii*, 1972).

4.4. Cultura de óvulos abortivos da cv. 'Pera' em diferentes meios

Um número significativamente baixo de embriões foi também obtido com a cv. 'Pera', quando diversas substâncias orgânicas e reguladores de crescimento foram adicionados ao meio de cultura (Tabela 11). Os índices mais elevados foram observados na presença de CH, EM, AC e EL, os quais não diferiram significativamente pelo teste de Tukey a 5%, enquanto níveis inexpressivos se observaram com a adição de AD, Cin e 2,4-D.

TABELA 11. Embriões (Nº), plantas e calos (%) obtidos em cultura de óvulos de 'Pera' em meio "MS" adicionado de diferentes substâncias de crescimento.

TRATAMENTO mg/l	Nº MÉDIO DE EMBRIÕES/ÓVULO	EMBRIÕES QUE PRODUZIRAM (%)	
		PLANTAS	CALOS
AA-40	0,11 d	0	0
EM-500	1,20 a	20	0
EL-500	0,66 abc	80	0
AC-10%	1,00 ab	50	20
CH-400	1,50 a	65	0
AD-40	0,22 cd	20	0
AD-40 + EM-500	0,40 bcd	50	0
AD-40 + Cin-0,25	0,20 cd	60	0
AD-40 + NAA-0,25 + ACi-2	0,25 cd	20	0
Cin-0,5 + 2,4-D-2	0,00 d	0	100

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey-5%.

Estes resultados estão de acordo com observações de que o EM (BITTERS *et alii*, 1970; KOCHBA e SPIEGEL-ROY, 1973; NAVARRO *et alii*, 1979), CH (SABHARWAL, 1963) e AC (BUTTON e BORNMAN, 1971; MITRA e CHATURVE SI, 1972) promovem embriogênese em tecido nucelar de citros, e que auxinas e citocininas a inibem (ESAN, 1973). O EL pareceu exercer influência significativa sobre a evolução dos embriões em plantas, o qual segundo ESAN (1973), apesar de não ter efeito sobre a embriogênese, aumenta o desenvolvimento dos órgãos em cultura de nucelos.

4.5. Desenvolvimento de pseudobulbilhos de 'Valência'

A evolução de pseudobulbilhos para proembriões e mesmo pa

ra embriões não foi significativamente estimulada pela adição de substâncias orgânicas complexas e vários reguladores de crescimento, cujo comportamento se mostrou estatisticamente igual ao tratamento testemunha (Tabela 12). A proliferação de novos pseudobulbilhos ou calos globulares tam

TABELA 12. Desenvolvimento de pseudobulbilhos cultivados em meio "MS" adicionado de diferentes substâncias de crescimento.

TRATAMENTO mg/l	Nº MÉDIO/FRASCO DE		FRASCOS COM CALOS (%)
	EMBRIÕES	PROEMBRIÕES	
Testemunha ("MS")	29,4 a	34,9 ab	55,6
EM-2500	19,4 ab	34,1 ab	71,4
EM-2500 + ADS-30	17,6 ab	46,2 a	63,6
EM-2500 + BAP-20	4,1 b	28,4 ab	37,5
ADS-40	8,8 ab	32,7 ab	30,0
GA ₃ -1	20,1 ab	28,2 ab	45,5
GA ₃ -1 + ADS-30	26,7 ab	23,0 ab	28,5
GA ₃ -10 + ADS-60	16,5 ab	20,8 b	48,6
GA ₃ -10	17,7 ab	39,4 ab	50,0
Cin-0,1 + IAA-1	11,7 ab	32,6 ab	34,6
Cin-1 + IAA-0,1	17,9 ab	26,9 ab	68,3
AC-10%	13,3 ab	21,6 ab	30,1
CH-400 + EL-500	17,7 ab	20,3 b	47,7

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey-5%.

bem apresentou valores elevados na testemunha comparada com os demais tratamentos. Isto mostra que o meio básico "MS", acrescido de EM-500 mg/l, fornece as condições necessárias tanto para a evolução dos pseudobulbilhos em proembriões e embriões como para proliferação de calos.

Estes resultados discordam em parte das observações feitas

por vários autores de que a formação de pseudobulbilhos com posterior trans formação em embriões e plantas é estimulada por EM + AD (BUTTON e BORN MAN, 1971; STARRANTINO *et alii*, 1978), por CH (RANGASWAMY, 1961; SABHARWAL, 1963), e outras citocininas (RANGASWAMY, 1958; KOCHBA e SPIEGEL-ROY, 1976a).

Citocininas, embora não essenciais à embriogênese, estimulam a formação de calos (STARRANTINO *et alii*, 1978), o que foi comprovado pela adição de Cin-1,0 mg/l + IAA-0,1 mg/l, cuja combinação é tida como padrão para cultura de calos nucelares de citros (KOCHBA e SPIEGEL-ROY, 1973a).

4.6. Irradiação de calos globulares de 'Valência'

Observe-se na Tabela 13 e Figura 10 que houve um nítido de crêscimo no número de embriões diferenciados à medida que se elevaram as doses de radiação gama. Não houve diferença significativa pelo teste Tukey entre os tratamentos testemunha (sem irradiação) e a dose 3 kR, os quais diferiram estatisticamente de todos os demais.

TABELA 13. Número de embriões obtidos de calos globulares submetidos a diferentes doses de radiação gama.

DOSE (kR)	0	3	6	9	12	15	18
Embriões por cultura (nº)	18,0 A	15,5 A	9,3 B	3,8 C	0,9 D	0,3 D	0,0 D
Embriões anormais (%)	16,5	22,5	38,9	41,4	63,8	51,1	58,2

As médias seguidas da mesma letra não diferiram entre si pelo teste Tukey-5%.

Estes resultados discordam daqueles obtidos por *SPIEGEL-ROY* e *KOCHBA (1973b)*, onde doses de 12 a 20 kR estimularam a embriogênese e, somente 28-32 kR apresentaram-se letais, porém, fazendo uso de uma baixa intensidade de dose (3,1 kR/h), enquanto no presente trabalho se usou 97 kR/h.

Obteve-se valores inexpressivos em 12 kR e atingindo níveis letais a 18 kR, ao passo que, os mesmos autores testando uma dose de 16kR, com intensidade de 100 kR/h, observaram apenas um efeito depressivo sobre o número de embriões. Trabalhos tem sido desenvolvidos (*KOCHBA et alii, 1980*) usando 8, 12 e 16 kR a 80 kR/h, objetivando introduzir tolerância a níveis mais elevados de NaCl e 2,4-D.

A percentagem de embriões anormais (fasciação, cotiledones agrupados e de tamanho diferente) na dose mais baixa de radiação (3 kR) foi praticamente igual a testemunha. Altos índices de anormalidade foram evidenciados nas doses mais elevadas de radiação (Tabela 13), o que está de acordo com observações anteriores feitas por *JUAREZ et alii (1976)*; *STARRAN TINO et alii (1978)*; entre outros.

Estes calos globulares se constituem numa excelente fonte de embriões e um material interessante para a aplicação de agentes mutagênicos em estágios anteriores ao início do processo de embriogênese, sem restrições sazonais e considerando a evidência da origem unicelular de seus embriões (*BUTTON et alii, 1974*). Células isoladas e protoplastos podem facilmente ser obtidos a partir destes calos e tratadas com mutagênicos, abrindo a possibilidade da aplicação de métodos de seleção aplicados a microorganismos.

FIGURA 10. Número de embriões obtidos de calos globulares submetidos a diferentes doses de radiação gama.

A sequência "uma célula à planta" foi estabelecida para uma série de cultivares de citros (*VARDI e SPIEGEL-ROY, 1982*) e, seu uso no melhoramento teria grande impacto, superando uma série de problemas relacionados com a reprodução sexuada das espécies cítricas.

4.7. Enraizamento de embriões de 'Valência'

Uma vez atingido o tamanho de 3-6 mm (Figura 11) os embriões

FIGURA 11. Embriões de 'Valência' obtidos de núcelos após nove semanas de cultura em meio básico "MS".

des são individualizados para que tenha continuidade o processo de desenvolvimento. Normalmente se dá primeiro a formação de raízes e depois da parte aérea (Figura 12). Ocorrendo o contrário há uma inibição do desenvolvimento das raízes.

Dentre os reguladores de crescimento, os principais responsáveis pelo enraizamento de embriões oriundos de calos nucelares, são o GA_3 -1 a 5 mg/l e o NAA-0,1 a 5 mg/l (Tabela 14). As maiores diferenças foram observadas destes hormônios para os demais tratamentos em embriões considerados grandes (maiores que 6 mm), tamanho normalmente utilizado para a individualização em meio de enraizamento. A formação de raiz em embriões médios (3-6 mm) e pequenos (menores que 3 mm) não foi estimulada

FIGURA 12. Desenvolvimento da plântula a partir de embriões de 'Valência' obtidos de cultura de nucelos e individualizados em meio básico 'MS'.

peia adição de substâncias reguladoras do crescimento, uma vez que não diferiram estatisticamente da testemunha. Comportamento similar tiveram os embriões oriundos diretamente do nucelo, onde, embora a adição de GA_3 -1 mg/l tivesse apresentado maior percentagem de enraizamento, não diferiu significativamente de NAA-0,1 e IBA-1,0 mg/l.

A ação do GA_3 -1,0 mg/l sobre o enraizamento já havia sido reportada (RANGASWAMY, 1961; KOCHBA *et alii*, 1972) com sucesso total para embriões bem desenvolvidos e com valores variáveis dependendo da cultivar.

O hormônio de enraizamento por excelência é o IBA, o que não se verificou para embriões oriundos de calos nucleares, mostrando inclu

sive um efeito detrimental sobre os embriões grandes, fato anteriormente evidenciado por KOCHBA e SPIEGEL-ROY (1976b). Estes autores atribuem também ao NAA este mesmo efeito, discordando do evidente estímulo ao NAA em várias concentrações (0,1 a 5,0 mg/l) sobre o enraizamento observado neste trabalho.

TABELA 14. Enraizamento de embriões (%) oriundos de calos nucelares e de nucelos em diversos hormônios adicionados ao meio "MS".

TRATAMENTO mg/l	TAMANHO DOS EMBRIÕES ORIUNDOS DE CALOS NUCELARES				EMBRIÕES ORIUNDOS DE NUCELOS
	GRANDE	MÉDIO	PEQUENO	MÉDIA	
"MS"	52,3 cde	40,9abc	29,9ab	41,0 bcd	46,5 bc
NAA-0,1	89,1a	53,1ab	38,2a	60,1a	54,0abc
NAA-1,0	63,9 bcde	49,8ab	32,4ab	48,7abc	39,5 bc
NAA-5,0	64,8abcd	46,5abc	34,9ab	48,7abc	
IAA-1,0	44,8 def	43,2abc	16,6ab	34,9 cd	28,5 c
IBA-1,0	23,2 f	39,8abc	24,9ab	29,3 d	60,0ab
GA ₃ -1,0	84,8ab	66,6a	37,3ab	62,9a	71,5a
GA ₃ -5,0	75,7abc	60,6ab	38,1ab	58,1ab	
ADS-27,0	35,7 ef	19,9 c	23,3ab	26,3 d	
GA ₃ -1,0 + ADS-27,0	37,3 def	33,1 bc	13,3 b	27,9 d	

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey-5%.

Um forte estímulo a formação de raiz foi observado quando plântulas obtidas "in vitro", apresentando apenas uma raiz principal, encurtada em aproximadamente 3 a 4 cm, foram transferidas para meio suplementado com NAA-0,1 e 1,0 mg/l. Obteve-se até 20 novas raízes por planta em 15% das plantas sob a influência do NAA-1,0 mg/l (Tabela 15).

TABELA 15. Desenvolvimento do sistema radicular de plântulas de 'Valência' (que apresentavam apenas a raiz principal) em meio "MS" adicionado de NAA.

NAA-0,1 mg/l		NAA-1,0 mg/l	
% DE PLANTAS	Nº DE RAIZES	% DE PLANTAS	Nº DE RAIZES
12	8	15	20
28	4	23	10
36	1 (apenas a principal)	18	5
24	0	44	Algumas esporádicas)

4.8. Cultura de gemas axilares

4.8.1. Cultivar 'Valência'

Como se observa na Tabela 16, houve para a cv. 'Valência' uma diferença altamente significativa quanto a número médio de brotos com mais de 1 cm de comprimento entre os diversos níveis de NAA e BAP, e também para a interação. Os desdobramentos de NAA dentro de BAP e de BAP dentro de NAA também mostraram significância ao nível de 1% para todos os casos, exceto para NAA dentro de BAP-5,0 mg/l e BAP dentro de NAA-5,0 mg/l.

Melhores resultados foram obtidos com NAA-0,0 e 0,2 mg/l tanto em termos médios como principalmente na dose mais baixa de BAP (0,2 mg/l). O BAP-0,2 mg/l foi significativamente superior aos demais tratamentos, tanto para a média como dentro de todos os níveis de NAA (Tabela 16, Figura 13). A combinação mais eficiente destes dois elementos se deu em NAA-0,2 e BAP-0,2 mg/l (Figura 14) com uma produção média de 6,18 novos brotos

TABELA 16. Número médio de brotos em cultura de gemas axilares de 'Valência' em diferentes combinações de BAP e NAA.

		NAA (mg/l)				Média
		0,0	0,2	2,0	5,0	
BAP (mg/l)	0,0	0,82 bc A	0,77 b AB 42,8 *	0,00 c C 33,3 *	0,19 BC 75,0 *	0,45 bc
	0,2	3,71 a A	6,18 a A	2,00 a B	0,73 C	3,16a
	2,0	1,66 b A	0,81 b AB	0,64 b AB	0,32 B	0,86 b
	5,0	0,56 c	0,07 b	0,52 bc	0,27	0,36 bc
	Média	1,69 A	1,96 A	0,79 B	0,38 B	

* brotos com raiz (%)

As médias seguidas da mesma letra (minúscula para níveis de BAP e maiúscula para níveis de NAA) não diferem entre si pelo teste Tukey-5%.

FIGURA 13. Número médio de brotos com mais de 1 cm, obtidos em cultura de gemas axilares de 'Valência' em diferentes combinações de NAA e BAP.

FIGURA 14. Multiplicação de 'Valência' a partir de gemas axilares cultivadas em NAA-0,2 mg/l e várias concentrações de BAP.

com mais de 1 cm por gema cultivada "in vitro".

4.8.2. Cultivar 'Trifoliata'

Na cultura de gemas axilares de 'Trifoliata' houve uma diferença altamente significativa com relação ao número de brotos, entre os diversos níveis de BAP e para a interação NAA x BAP. O desdobramento para BAP dentro de NAA foi significativo a 1% para todos os níveis de NAA, enquanto o desdobramento para NAA dentro de BAP mostrou-se com significância a 1% apenas dentro de BAP-5,0 e 10,0 mg/l (Tabela 17).

O teste de Tukey a 5% indicou BAP-1,0 mg/l como o tratamento que produziu o maior número de brotos, diferindo de todos os demais para a

média e dentro de cada nível de NAA, exceto para NAA-0,0 mg/l, onde BAP-1,0 e BAP-0,1 mg/l foram estatisticamente iguais (Tabela 17 e Figura 15).

TABELA 17. Número médio de brotos em cultura de gemas axilares de 'Trifoliata' em diferentes níveis de NAA e BAP.

	NAA (mg/l)					MÉDIA
	0,0	0,1	1,0	5,0	10,0	
BAP (mg/l)						
0,0	0,66 c	0,74 c	0,89 c 11*	0,49 d	0,37 d	0,63 e
0,1	4,37ab 12*	3,18 b 10*	3,69 b 10*	3,49 b 40*	2,77 b 12*	3,50 b
1,0	4,84a (12)	6,11a (15)	7,00a (13)	5,69a (12)	4,94a (33)	5,72a
5,0	3,08 b A (22)	0,79 cB (60)	1,30 c B (80)	1,42 c B (44)	1,66 bc B (33)	1,65 c
10,0	0,55 cBC (55)	2,16 b A	0,22 dC (10)	1,29 c AB (60)	1,39 c A (89)	1,12 d
Média	2,70	2,60	2,62	2,48	2,23	

* = brotos com raiz(%); () = explantes com calos.

As médias seguidas da mesma letra (minúscula para níveis de BAP e maiúscula para níveis de NAA) não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

A maior produção de brotos em 'Trifoliata' se deu com a combinação BAP-1,0 e NAA-1,0 mg/l, porém, não diferindo estatisticamente de todas as demais doses de NAA, neste nível de BAP.

Resultados similares foram obtidos por CHATURVEDI e MITRA (1974) com o cultivo de gemas axilares de *Citrus grandis* em meio suplementado por NAA-0,1 + BA-0,25 mg/l, produzindo até 20 a 30 novas gemas a partir de um único explante. A adição de Cin-1,0 + BA-1,0 mg/l (BOUZID, 1975)

FIGURA 15. Número médio de brotos com mais de 1 cm obtidos em cultura de gemas axilares de 'Trifoliata' em diferentes combinações de NAA e BAP.

ou apenas de BA-0,5 a 2,0 mg/l (BARLASS e SKENE, 1982) também promoveram uma boa multiplicação de gemas axilares.

Usando este sistema de propagação "in vitro", é possível regenerar gemas adventícias e recuperar plantas geneticamente homogêneas derivadas de camadas histogênicas diferentes de um indivíduo quimérico.

O tratamento mutagênico aplicado a um meristema apical dará origem a uma quimera setorial ou mericlinal. Estruturas periclinais podem ser obtidas por culturas repetidas de gemas axilares derivadas do ápice tratado. Este procedimento, usado com a macieira (*Malus domestica* Borkh.) cv 'Annurca' (DONINI, 1982), tem permitido um crescimento contínuo e micropro

pagação do material até a geração V_2 em 4 meses, facilitando o isolamento de mutações somáticas induzidas e aumentando sua frequência. Os ramos V_2 podem ser enraizados ou enxertados, originando em 6 meses plantas V_3 prontas para serem levadas ao campo.

As doses mais elevadas de BAP (a partir de 1,0 mg/l - Tabela 17), independentemente da presença de NAA, evidenciaram alta percentagem de explantes que formaram calos. Estes calos de coloração esverdeada cresceram abundantemente e mostraram elevada capacidade de regeneração de plantas, constituindo-se num material muito interessante para estudos de indução de mutações.

Formação de calos a partir de segmentos de caule e folha com posterior diferenciação de plantas foi anteriormente registrado por muitos autores (GRIMBLAT, 1972; CHATURVEDI e MITRA, 1974; BHANSALY e ARYA, 1979), utilizando várias concentrações de NAA e BAP em diferentes cultivares.

O comportamento de vários genótipos, no caso 'Valência' e 'Trifoliata', não é o mesmo frente a diferentes combinações de auxina e citocinina, o que evidencia a necessidade deste tipo de trabalho para cada cultivar, até mesmo dentro de uma mesma espécie.

4.8.3. Enraizamento de brotos

O meio adicionado de NAA-0,1 ou 1,0 + IBA-2,0 mg/l foi o que proporcionou o maior índice de enraizamento de brotos para 'Valência', enquanto para 'Trifoliata' os melhores resultados foram obtidos com IBA-2,0 mg/l e NAA-5,0 + BAP-0,1 mg/l (Tabela 18, Figura 16).

TABELA 18. Enraizamento de brotos (%) de 'Valência' e 'Trifoliata' em meio "MS" suplementado por vários reguladores de crescimento.

TRATAMENTO mg/l	ENRAIZAMENTO (%)	
	'Valência'	'Trifoliata'
NAA-0,1	43,0 e	31,5 c
NAA-0,5	53,0 de	11,0 e
NAA-1,0	81,0 bc	27,0 cd
NAA-5,0	26,0 f	15,0 de
IBA-1,0	85,0 bc	53,0 ab
IBA-2,0	77,0 c	63,5 a
IBA-5,0	60,5 d	-
IBA-10,0	61,5 de	-
NAA-0,1 + IBA-2,0	91,0 ab	36,5 bc
NAA-1,0 + IBA-2,0	96,0 a	52,0 ab
NAA-1,0 + IBA-5,0	44,5 de	-
NAA-5,0 + IBA-2,0	60,0 de	30,0 c
NAA-5,0 + BAP-0,1	53,5 de	60,0 a
GA ₃ -5,0	12,5 g	8,5 e

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey-5%.

O NAA-0,1 a 2,5 mg/l sozinho ou combinado com alguma citocinina é citado como sendo o hormônio responsável pelo enraizamento de brotos de várias espécies de citros (RANGASWAMY, 1975; BARLASS e SKENE, 1982). Este acentuado efeito do NAA também foi observado, antes da individualização dos brotos para meio de enraizamento, para 'Valência' na ausência de BAP (Tabela 16) e para 'Trifoliata' com adição de BAP-0,1 mg/l (Tabela 17).

FIGURA 16. Enraizamento de brotos de 'Trifoliata' em meio 'MS' adicionado de IBA-2,0 mg/l.

4.9. Cultura de segmentos do fruto de 'Pera'

Calos a partir de albedo e vesículas de frutos jovens de 'Pera' foram obtidos praticamente em todas as combinações de Cin e 2,4-D (Tabela 19), e Cin e IAA (Tabela 20). Todos estes calos continuaram sendo mantidos a luz ou no escuro por longos períodos, com transferências a intervalos de 2 meses, em meio suplementado por Cin-0,25 + 2,4-D-0,5 mg/l, apresentando ótimo crescimento.

TABELA 19. Produção de calos (%) da cv. 'Pera' a partir de albedo e vesículas em meio "MT" adicionado de diferentes concentrações de Cin e 2,4-D.

TRATAMENTO mg/l	% DE EXPLANTES COM CALOS			
	ALBEDO		VESTÍCULAS	
	LUZ	ESCURO	LUZ	ESCURO
Cin-0,0 + 2,4-D-0,0	100	40	0	0
Cin-0,0 + 2,4-D-0,5	100	80	100	80
Cin-0,0 + 2,4-D-1,0	100	60	100	80
Cin-0,0 + 2,4-D-2,0	60	40	100	100
Cin-0,25 + 2,4-D-0,0	100	70	100	100
Cin-0,25 + 2,4-D-0,5	100	75	100	20
Cin-0,25 + 2,4-D-1,0	100	0	100	100
Cin-0,25 + 2,4-D-2,0	100	50	100	100
Cin-0,5 + 2,4-D-0,0	75	40	40	25
Cin-0,5 + 2,4-D-0,5	100	60	100	100
Cin-0,5 + 2,4-D-1,0	100	50	100	100
Cin-0,5 + 2,4-D-2,0	75	20	100	70
Cin-1,0 + 2,4-D-0,0	0	0	60	60
Cin-1,0 + 2,4-D-0,5	100	0	100	75
Cin-1,0 + 2,4-D-1,0	60	40	100	100
Cin-1,0 + 2,4-D-2,0	25	100	50	100

Nenhum sinal de crescimento de calos foi observado nos segmentos de flavedo.

Indução e crescimento de calos a partir de segmentos de frutos cítricos foram verificados por alguns autores (EINSET, 1978; NITSCH, 1965; KATO, 1980) para várias espécies, utilizando muitas combinações de auxinas e citocininas e, de modo geral, caracterizando 2,4-D e IAA como hormônios indutores de calos nestes tecidos.

TABELA 20. Produção de calos (%) da cv. 'Pera' a partir de albedo e vesículas em meio "M" adicionado de diferentes concentrações de Cin e IAA.

TRATAMENTOS mg/l	% DE EXPLANTES COM CALOS			
	ALBEDO		VESÍCULAS	
	LUZ	ESCURO	LUZ	ESCURO
Cin-0,0 + IAA- 0,0	0	60	0	100
Cin-0,0 + IAA- 0,175	0	100	100	100
Cin-0,0 + IAA- 1,75	20	100	20	100
Cin-0,0 + IAA-17,5	100	100	100	100
Cin-0,215 + IAA- 0,0	0	100	0	100
Cin-0,215 + IAA- 0,175	40	100	0	100
Cin-0,215 + IAA- 1,75	40	100	40	100
Cin-0,215 + IAA-17,5	0	100	100	100
Cin-2,15 + IAA- 0,0	0	0	0	100
Cin-2,15 + IAA- 0,175	60	100	0	100
Cin-2,15 + IAA- 1,75	100	100	100	100
Cin-2,15 + IAA-17,5	20	100	100	100

Não se obteve até então regeneração de plantas destes calos, porém, os mesmos se prestam para estudos de fenômenos morfológicos, citológicos e fisiológicos que podem ser conduzidos "in vitro", alheios à complexidade de fatores que interagem na planta e às limitações de natureza sazonal.

4.10. Remoção das plantas para o solo

Tem se conseguido um índice próximo a 100% de sobrevivência utilizando o seguinte procedimento:

- . Plântulas com 2-3 pares de folhas (Figura 17) são removidas dos tubos de ensaio e lavadas em água corrente para eliminar os restos de meio de cultura a elas aderido.

FIGURA 17. Plântulas de 'Valência' obtidas de cultura de nucelos, prontas para serem removidas dos tubos de ensaio para o solo.

- . Nos casos em que o meio apresenta alguma contaminação, faz-se uma imersão das plântulas em uma solução com fungicida (Benomyl-0,6%) por aproximadamente 5 minutos.
- . A seguir, as plântulas são acondicionadas em potes plásticos contendo

uma mistura de terra, esterco e areia (4:2:1), e mantidas em câmara úmida, onde a umidade é fornecida por um umidificador e cujo índice é controlado por um "time-switch".

. Nestas condições, são mantidas por aproximadamente 10 dias, sendo que a cada dia procede-se uma diminuição do índice de umidade.

. Posteriormente, em casa de vegetação, permanecem em torno de 1 mês, quando são transferidas para sacos plásticos maiores ou vasos com o mesmo substrato (Figura 18).

FIGURA 18. Plântula de 'Valência' obtida de cultura de núcelos, com aproximadamente 1 ano após a remoção dos tubos de ensaio.

.91.

. Durante todo este período, as plântulas são umedecidas com a solução nutritiva de HOAGLAND.

Uma vez bem estabelecidas as plântulas são selecionadas de acordo com o objetivo proposto.

5. CONCLUSÕES

Para as condições em que o presente trabalho foi desenvolvido conclue-se que:

- a) A data limite para extração dos núcelos da cultivar 'Valência' é 12 semanas após a polinização.
- b) Pode-se obter "in vitro" até 12 embriões diretamente de um único núcelo, sem a adição de reguladores de crescimento.
- c) Adição de auxinas e citocininas inibe a embriogênese em núcelos e o desenvolvimento de embriões.
- d) Há uma formação esporádica de calos globulares altamente embriogênicos a partir de núcelos, independentemente do meio de cultura e, mais marcante com adição de cinetina-0,25 + 2,4-D-0,5 mg/l.
- e) O aumento das doses de radiação gama sobre núcelos provoca uma redução do número de embriões, acentuada em fases mais distantes da inoculação.

- f) Para indução de mutações em citros pode-se recomendar as doses de 1,0 a 2,0 kR, aplicadas a nucelos por ocasião da inoculação ou uma semana depois.
- g) A irradiação apenas do meio de cultura aumenta a proliferação de calos, principalmente em doses mais elevadas (12 kR).
- h) Há um elevado índice de anormalidades nos embriões, o qual acentua-se com as doses mais altas de radiação, originando, porém, plantas aparentemente normais.
- i) Óvulos abortivos de 'Pera' originam embriões à luz e calos altamente embriogênicos no escuro. O número de embriões obtidos com 'Pera' é significativamente inferior ao de 'Valência'.
- j) Há uma crescente redução do número de embriões diferenciados de calos nucleares com o aumento das doses de radiação gama, sendo letal em 18 kR.
- k) O enraizamento de embriões é melhor estimulado pela adição de GA_3 - 1,0 mg/l ou NAA - 0,1 mg/l.
- l) A multiplicação de gemas de 'Valência' é mais estimulada por NAA 0,2 + BAP-0,2 mg/l e de 'Trifoliata' por NAA-1,0 + BAP-1,0 mg/l; doses mais altas de BAP (acima de 1,0 mg/l) produzem calos com elevado potencial morfogênico.
- m) Melhor enraizamento de brotos de 'Valência' é obtido com NAA-0,1 a 1,0 + IBA-2,0 mg/l e de 'Trifoliata' com IBA-1,0 a 2,0 mg/l, ou NAA-5,0 + BAP-0,1 mg/l, ou NAA-1,0 + IBA-2,0 mg/l.

- n) Calos de albedo e vesículas são obtidos de praticamente todas as combinações de cinetina + 2,4-D e de cinetina + IAA, porém, sem regeneração de plantas.

6. LITERATURA CITADA

- ALTMAN, A. e R. GOREN, 1971. Promotion of callus formation by abscisic acid in Citrus bud cultures. Plant Physiology. Washington, 47:844-846.
- ALTMAN, A. e R. GOREN, 1974. Growth and dormancy cycles in Citrus bud cultures and their hormonal control. Physiol. Plantarum. Kopenhagen, 30(3):240-245.
- ALTMAN, A. e R. GOREN, 1977. Horticultural and physiological aspects of citrus bud culture. Acta Horticulturae. 78:51-60.
- BACCHI, O., 1943. Cytological observations in citrus: III. Megasporeogenesis, fertilization and polyembryony. Bot. Gaz. Chicago, 105:221-225.
- BAR-AKIVA, A.; J. SAGIV e O. REUVENI, 1974. Physiological approaches to plant nutrition problems. Proc. 7th Int. Colloq. Plant Analysis and Fertilizer Problems. Hannover, W. Germany, :13-23.
- BARLASS, M. e K.G.M. SKENE, 1982. In vitro plantlett formation from citrus species and hybrids. Scientia Horticulturae. 17:333-341.
- BEN-HAYYIM, G. e J. KOCHBA, 1982. Growth characteristics and stability of tolerance of citrus callus cells subjected to NaCl stress. Plant Science Letters. Amsterdam, 27(1):87-94.

- BHANSALY, R.R. e H.C. ARYA, 1978. Differentiation in explant of *Citrus paradisi* Macf. (grapefruit) grown in culture. Indian J. Exp. Biol. New Delhi, India, 16:409-421.
- BHANSALY, R.R. e H.C. ARYA, 1979. Organogenesis in *Citrus limettioides* (Sweet lime) callus culture. Phytomorphology. New Delhi, India, 29: 97-100.
- BITTERS, W.P.; T. MURASHIGE; T.S. RANGAN e E. NAUER, 1970. Investigations on established virus-free citrus plants through tissue cultures. Calif. Citrus Nurserymen's Soc. Los Angeles, California, 9:27-30.
- BOTTINO, P.J., 1975. The potential of genetic manipulation in plant cell cultures for plant breeding. Radiation Botany. 15:1-16.
- BOUZID, S.M., 1975. Quelques traits du comportement de boutures de Citrus en culture in vitro. C. R. Hebed. Seances Acad. Sci. Paris, Serie D, 280:1689-1692.
- BRUNET, G. e R.K. IBRAHIM, 1973. Tissue culture of Citrus peel and its potential for flavonoid synthesis. Z. Pflanzenphysiol. Berlin, 69: 152-162.
- BUTTON, J. e C.H. BORNMAN, 1971. Development of nucellar plants from unpollinated and unfertilised ovules of the washington navel orange in vitro. Journal South African Botany. 37(2):127-134.
- BUTTON, J. e C.E.J. BOTHA, 1975. Enzymatic maceration of Citrus callus and the regeneration of plants from single cells. Journal of Experimental Botany. Oxford, London, 26(94):723-729.
- BUTTON, J. e J. KOCHBA, 1977. Tissue culture in the citrus industry. In: REINERT, J. e Y.P.S. BAJAJ (Eds.). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Berlin, Springer-Verlag: 70-92.

- BUTTON, J.; J. KOCHBA e C.H. BORNMAN, 1974. Fine structure of and embryoid development from embryogenic ovular callus of "shamouti" orange (*Citrus sinensis* Osb.). Journal of Exp. Bot. Oxford, London, 25(85): 446-457.
- BUTTON, J. e F.H.J. RIJKENBERG, 1977. The effect of subculture interval on organogenesis in callus cultures of "*Citrus sinensis*". Acta Horticulturae. 78:225-235.
- BUTTON, J.; A. VARDI e P. SPIEGEL-ROY, 1976. Root peroxidase isoenzymes as an aid in citrus breeding and taxonomy. Theoretical and Applied Genetics. Berlin, 47:119-123.
- CAILLOUX, M. 1984. Plant tissue culture: rapid propagation, induced mutations, and the potential role of protoplast techniques. In: VOSE, P.B. e S.G. BLIXT. CROP BREEDING (A CONTEMPORARY BASIS), New York, p. 311-346.
- CAMERON, J.W. e H.B. FROST, 1968. Genetics, breeding, and nucellar embryony. In: REUTHER, W.; L.D. BATCHELOR e H.J. WEBBER, Ed. The Citrus Industry. Berkeley, University of California Press, 2:325-370.
- CAMERON, J.W. e R.K. SOOST, 1969. Citrus. In: Outlines of perennial crop breeding in the tropics. Wageningen, H. Veenman and Zonen, 129-162.
- CHATURVEDI, H.C.; A.R. CHOWDHURY e G.C. MITRA, 1974. Shoot-bud differentiation in stem-callus tissue of *Citrus grandis* and correlated changes in its free amino acid content. Current Science. Bangalore, India, 43(7):536-537.
- CHATURVEDI, H.C. e G.C. MITRA, 1974. Clonal propagation of Citrus from somatic callus cultures. HortScience. Virginia, USA, 9(2):118-120.
- CHOUREY, P.S.; H.H. SMITH e N.C. COMBATTI, 1973. Effects of X irradiation and indolacetic acid on specific peroxidase isozymes and pith tissue of a *Nicotiana* amphiploid. Amer. J. Bot. Ohio, 60(9):853-857.

- DEIDDA, D. 1973. Embrioni nucellari di clementine ottenuti in vitro. Revista della Ortofloro-frutticoltura Italiana. 54(4):291-296.
- DEVREUX, M. 1973. In vitro culture and mutation breeding. In: Induced Mutations in Vegetatively Propagated Plants. Vienna, IAEA, 41-51.
- DONINI, B. 1982. Mutagenesis applied to improve fruit trees. In: Induced Mutations in Vegetatively Propagated Plants II (Proc. Res. Co-ordination Meet., Coimbatore, 1980). Vienna, IAEA, 29-36.
- EINSET, J.W. 1978. Citrus Tissue Culture: stimulation of fruit explant cultures with orange juice. Plant Physiology. Washington, 62(6): 885-888.
- ERNER, Y.; O. REUVENI e E.E. GOLDSCHMIDT, 1975. Partial purification of a growth factor from orange juice which affects Citrus tissue culture and its replacement by citric acid. Plant Physiol. Washington, 56: 279-282.
- ESAN, E.B. 1973. A detailed study of adventive embryogenesis in the rutaceae. University of California, Riverside (dissertação), 233 p.
- ESEN, A. e R.K. SOOST, 1976. Peroxidase polymorphism in Citrus. J. Hered. Washington, 67:199-203.
- ESEN, A. e R.K. SOOST, 1977. Adventive embryogenesis in Citrus and its relation to pollination and fertilization. Am. J. Bot. Ohio, 64(6): 607-14.
- FROST, H.B. e R.K. SOOST, 1968. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: REUTHER, W.; L.D. BATCHELOR e H.J. WEBBER, Ed. The Citrus Industry. Berkeley, University of California Press, 2:290-324.
- GALSTON, A.W. e P.J. DAVIES, 1969. Hormonal regulation in higher plants. Science. Washington, 163:1288-1289.

- GILADI, I.; A. ALTMAN e R. GOREN, 1979. A method for aseptic culture of bud explants from citrus trees. Scientia Horticulturae, 10:357-362.
- GILFILLAN, I.M.; J.A. STEVENSON e W. KOEKEMOER, 1974. Gibberellic acid reduces creasing in late-season navels. Citrus and Subtrop. Fruit J. 482:4-5.
- GRIMBLAT, U., 1972. Differentiation of Citrus stem "in vitro". J. Amer. Soc. Hort. Sci. Virginia, 97(5):599-603. .
- HEINZ, D.J., 1973. Sugar-cane improvement through induced mutations using vegetative propagules and cell culture techniques. In: Induced Mutations in Vegetatively Propagated Plants. Vienna, IAEA, 53-59.
- HENSZ, R.A., 1972. Introducing star-ruby-the new Texas grapefruit. The Packer. 1:913.
- HORIUCHI, S.; E. YUDA e S. NAKAGAWA, 1976. In vitro culture of young embryo in polyembryonic citrus (I). J. Japanese Soc. Hort. Sci. 45(3): 253-260.
- IGLESIAS, L.; H. LIMA e J.P. SIMON, 1974. Isoenzyme identification of zygotic and nucellar seedlings in Citrus. The Journal of heredity. Washington, 65:81-84.
- JUAREZ, J.; L. NAVARRO e J.L. GUARDIOLA, 1976. Obtention de plants nucellaires de divers cultivars de clémentiniers au moyen de la culture de nucelle "in vitro". Fruits. Paris, 31(12):751-762.
- KATO, YUKIO, 1980. Studies on juice vesicles isolated from mature and immature citrus fruit. J. Japan Soc. Hort. Sci. 49(1):36-40.
- KOCHBA, J. e J. BUTTON, 1974. The stimulation of embryogenesis and embryoid development in habituated ovular callus from the "shamouti" orange (*Citrus sinensis*) as affected by tissue age and sucrose concentration. Journal of Plant Physiology. Berlin, 73:415-421.

KOCHBA, J.; J. BUTTON; P. SPIEGEL-ROY; C.H. BORNMAN e M. KOCHBA, 1974.

Stimulation of rooting of Citrus embryoids by gibberellic acid and adenine sulphate. Ann. Bot. Oxford, London, 38:795-802.

KOCHBA, J. e P. SPIEGEL-ROY, 1973. Effect of culture media on embryoid formation from ovular callus of 'shamouti' orange (*Citrus sinensis*). Journal of Plant Breeding. Berlin, 69:156-162.

KOCHBA, J. e P. SPIEGEL-ROY, 1976a. Improvement of plant production in citrus by tissue cultures. The Plant Propagation. 22(1):11-12.

KOCHBA, J. e P. SPIEGEL-ROY, 1976b. The use of Citrus tissue culture for mutation breeding: Effects of plant growth substances and gamma irradiation on embryogenesis. Improvement of Vegetatively Propagated Plants and Tree Crops through Induced Mutations. Vienna, IAEA, 194: 83-91.

KOCHBA, J. e P. SPIEGEL-ROY, 1977a. Cell and tissue culture for breeding and developmental studies of Citrus. HortScience. Virginia, USA, 12(2):110-114.

KOCHBA, J. e P. SPIEGEL-ROY, 1977b. Embryogenesis in gamma-irradiated habituated ovular callus of the "shamouti" orange as affected by auxin and by tissue age. Environmental and Experimental Botany. Oxford, London, 17(2-4):151-159.

KOCHBA, J. e P. SPIEGEL-ROY, 1982. Progress in selection for sodium chloride, 2,4-D dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) and streptomycin tolerance in *Citrus sinensis* ovular callus lines. In: Induced Mutations in Vegetatively Propagated Plants II (Proc. Res. Co-ordination Meeting, Coimbatore, 1980). Vienna, IAEA, 77-89.

KOCHBA, J.; P. SPIEGEL-ROY e S. SAAD, 1980. Selection for tolerance to sodium chloride (NaCl) and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in ovular callus lines of *Citrus sinensis*. In: Plant Cell Cultures: Results and Perspectives. 187-192.

- KOCHBA, J.; P. SPIEGEL-ROY e H. SAFRAN, 1972. Adventive plants from ovules and nucelli in Citrus. Planta. Berlin, 106:237-245.
- KORDAN, H.A., 1963. Growth characteristics of Citrus fruit tissue in vitro. Nature. London, 198:867-869.
- KORDAN, H.A., 1965. Nucleolar activity and starch synthesis in lemon fruit tissue in vitro. Bulletin of the Torrey Botanical Club. New York, 92(1):21-37.
- LAPINS, K.O., 1973. Induced mutations in fruit trees. Induced Mutations in Vegetatively Propagated Plants (Proc. Panel Vienna, 1972), IAEA, Vienna, 329:1-20.
- LESCURE, A.M., 1973. Selection of markers of resistance to base-analogues in somatic cell cultures of *Nicotiana tabacum*. Plant Sci. Letters. Amsterdam, Netherlands, 1(9):375.
- LETHAN, D.S., 1958. Cultivation of apple-fruit tissue in vitro. Nature. London, 182:473-474.
- MAHESHWARI, P. e N.S. RANGASWAMY, 1958. Polyembryony and in vitro culture of Citrus and Mangifera. Indian J. Hort. Bangalore, India, 15:275-286.
- MATSUMOTO, K., 1983. Induction of adventitious buds and their selection for NaCl - tolerant lines in Rutaceae. Tokyo, 54 p. (Tese).
- MELCHERS, G., 1972. Haploid higher plants for plant breeding. Z. Pflanzenzuchtg., 67:19-32.
- MITRA, G.C. e H.C. CHATURVEDI, 1972. Embryoids and complete plants from unpollinated ovaries and from ovules of in vivo grown emasculated flower buds of *Citrus* spp. Bull. Torrey Bot. Club. New York, 99:184-189.
- MOREIRA, S.; J.T.A. GURGEL e L.F. ARRUDA, 1947. Poliembrionia em Citrus. Bragantia. Campinas, São Paulo, 7:69-106.

- MURASHIGE, T.; W.P. BITTERS; E.M. RANGAN; E.M. NAUER; C.N. ROISTACHER e B.P. HOLLIDAY, 1972. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citros clones. HortScience. Virginia, 7:118-119.
- MURASHIGE, T. e F. SKOOG, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum. Kopenhagen 15:473-497.
- MURASHIGE, T. e D.P.H. TUCKER, 1969. Growth factor requirements of citrus tissue culture. In: CHAPMAN, H.D., Ed. Proc. First Int. Citrus Symp. Riverside, California, 3:1155-1161.
- NAVARRO, L. e J. JUAREZ, 1977a. Elimination of Citrus pathogens in propagative budwood. II. In vitro propagation. Proc. Int. Soc. Citriculture. 3:973-987.
- NAVARRO, L. e J. JUAREZ, 1977b. Tissue culture techniques used in Spain to recover virus-free citrus plants. Acta Horticulturae. 78:425-435.
- NAVARRO, L.; J. JUAREZ; J.F. BALLESTER; J.A. PINA e C. ORTEGA, 1979. Obtención de plantas nucelares libres de virus de diversas variedades de agrios del grupo Navel (*C. sinensis* (L.) Osbeck) por cultivo de ovulos "in vitro". Anales del I.N.I.A. Madrid, Serie Proteccion Vegetal, 12:95-113.
- NAVARRO, L.; C.N. ROISTACHER e T. MURASHIGE, 1975. Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus-free Citrus. J. Am. Soc. Hort. Sci. Virginia, 100(5):471-479.
- NITSCH, J.P., 1965. Culture in vitro de tissus de fruits. II. Orange. Bull. Soc. Bot. Fr. Paris, 112:19-22.
- NYBOM, N., 1970. Mutation breeding of vegetatively propagated plants. In: Manual on Mutation breeding. Vienna, IAEA, 119:141-148.

- OHATA, Y. e K. FURUSATO, 1957. Embryoculture in Citrus. Rep. Kihara Inst. Biol. Res. Yokohama, Japão, 8:49-54.
- PIERINGER, A.P. e G.J. EDWARDS, 1965. Identification of nucellar and zygotic Citrus seedlings by infrared spectroscopy. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. Virginia, 84:226-234.
- PARAKH, L.J. e D.A. METHA, 1970. Studies on callus tissue of lemon fruit vesicle (*Citrus acida*) cultivated in vitro. Current Science. Bangalore, India, 39:513-515.
- PARLEVLIET, J.E. e J.W. CAMERON, 1959. Evidence on the inheritance of nucellar embryony in Citrus. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. Virginia, 74:252-260.
- RANGAN, T.S.; T. MURASHIGE e W.P. BITTERS, 1968. In vitro initiation of nucellar embryos in monoembryonic Citrus. HortScience. Virginia, 3:226-227.
- RANGAN, T.S.; T. MURASHIGE e W.P. BITTERS, 1969. In vitro studies of zygotic and nucellar embryogenesis in citrus. In: CHAPMAN, H.D., Ed. Proc. First Int. Citrus Symp. Riverside, California, 1:225-229.
- RANGASWAMY, N.S., 1958. Culture of nucellar tissue of Citrus in vitro. Experientia. New York, 14(3):111-112.
- RANGASWAMY, N.S., 1959. Morphogenetic response of Citrus ovules to growth adjuvants in culture. Nature. London, 183(4663):735-736.
- RANGASWAMY, N.S., 1961. Experimental studies on female reproductive structures of *Citrus microcarpa* Bunge. Phytomorphology. New Delhi, 11:108-127.
- RANGASWAMY, N.S., 1975. Morphogenesis in explants of "*Citrus microcarpa*" Bunge grown in vitro. Indian J. Exp. Biology. 13(2):213-215.

- SABHARWAL, P.S., 1963. In vitro culture of ovules; nucelli and embryos of *Citrus aurantifolia* Swingle. In: MAHESHWARI, P. Ed. Plant Embryology - a symposium. Nova Delhi, 239-243.
- SCHROEDER, C.A.; E. KAY e L.M. DAVIS, 1962. Totipotency of cells from fruit pericarp tissue in vitro. Science. Washington, 138:595-596.
- SCHROEDER, C.A. e C. SPECTOR, 1957. Effect of gibberellic acid and indolacetic acid on growth of excised fruit tissue. Science. Washington 126:701-702.
- SHARP, W.R. e D.A. EVANS, 1981. Plant tissue culture: the foundation for genetic engineering in higher plants. In: CROCOMO et alii. Genetic Engineering for Biotechnology (Proc. Int. Symp. on Gen. Eng.), Piracicaba/SP., PROMOCET, 23-28.
- SINGH, V.P., 1963. Raising nucellar seedlings of some Rutacea in vitro. In: Plant Tissue and Organ Culture Int. Symp. Delhi, 275-277.
- SKOOG, F. e C.O. MILLER, 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultivated in vitro. In: Biological Action of Growth Substances. 11th Symp. Soc. Exp. Biol. 11:118-131.
- SPIEGEL-ROY, J. e J. KOCHBA, 1973a. Mutation breeding in Citrus. In: Induced Mutations in Vegetatively Propagated Plants. Vienna, IAEA, 91-104.
- SPIEGEL-ROY, P. e J. KOCHBA, 1973b. Stimulation of differentiation in orange (*Citrus sinensis*) ovular callus in relation to irradiation of the media. Radiation Botany. Oxford, 13:97-103.
- SPIEGEL-ROY, P. e J. KOCHBA, 1975. Production of solid mutants in Citrus, utilizing new approaches and techniques. In: Imp. Veg. Prop. Plants through Ind. Mut. (Proc. Res. Meeting). Tokai, Japan, IAEA, 73:117-127.

- SPIEGEL-ROY, P. e J. KOCHBA, 1977.* Application of tissue culture for plant improvement. In: BARZ, W.; E. REINHARD e M.H. ZENK - Plant Tissue Culture and its bio-technological application. Springer-Verlag, New York, pp. 404-413.
- SPIEGEL-ROY, P. e J. KOCHBA, 1980.* Embryogenesis in Citrus Tissue Cultures. In: FIECHTER, A. Ed. Advances in biochemical engineering. Berlin, Springer-Verlag, 27-48.
- STARRANTINO, A. e F. RUSSO, 1980.* Seedlings from undeveloped ovules of ripe fruits of polyembryonic citrus cultivars. HortScience. Virginia, 15(3):296-297.
- STARRANTINO, A. e F. RUSSO, 1983.* Reproduction of seedless orange cultivars from undeveloped ovules raised in vitro. Acta Horticulturae. Hamburg, Germany, 131:253-258.
- STARRANTINO, A.; P. SPINA e F. RUSSO, 1978.* Embriogenesi nucellare e sviluppo di piantine in vitro dalle nucelle di alcune specie di agrumi. Giorn. Bot. Ital. 112:41-52.
- STEWART, F.C.; P.V. AMMIRATO e M.O. MAPES, 1970.* Growth and development of totipotent cells. Ann. Bot. Oxford, London, 34:761-787.
- TATUM, J.H.; R.E. BERRY e C.J. HEARN, 1974.* Characterization of Citrus cultivars and separation of nucelar and zygotic seedlings by thin layer chromatography. Proc. Fla St. Hort. Soc. Talahassee, 87:75-81.
- TATUM, J.H.; C.J. HEARN e R.E. BERRY, 1978.* Characterization of Citrus cultivars by chemical differentiation. J. Amer. Soc. Hort. Sci. Virginia, 103(4):492-496.
- TEICH, A.H. e P. SPIEGEL-ROY, 1972.* Differentiation between nucellar and zygotic citrus seedlings by leaf shape. Theoret. Appl. Genet. Berlin, 42:314-315.

- THORPE, T.A.; V.P. MAIER e S. HASEGAWA, 1971. Phenylalanine ammonia-lyase activity in citrus fruit tissue cultured in vitro. Phytochemistry. New York, 10:711-718.
- TORREY, J.G., 1966. The initiation of organized development in plants. Adv. Morphogenesis. 5:39-91.
- TUSA, N.; G. CERACI e G. OCCORSO, 1983. Coltura in vitro di ovuli in due specie di agrumi. Riv. Ortoflorofruitt. Italiana. 67:129-138.
- VARDI, A. e P. SPIEGEL-ROY, 1982. Plant regeneration from Citrus protoplasts: variability in methodological requirements among cultivars and species. Theor. Appl. Genet. Berlin, 62:171-176.
- VARDI, A.; P. SPIEGEL-ROY e E. GALUN, 1975. Citrus cell culture: isolation of protoplasts, plating densities, effect of mutagens and regeneration of embryos. Plant Science Letters. Amsterdam, Netherlands, 4:231-236.
- UNGER, J.W. e K.A. FENG, 1978. Growth and differentiation of juice vesicles of orange grown in vitro. Amer. J. Bot. Ohio, 65(5):511-515.
- WIDHOLM, J.M., 1978. Problem and selecting mutant cells. Newsletter. 23:2-6.